

**Physiologische und biochemische Untersuchungen
zur Taxonomie der Gattung Bifidobacterium
Orla-Jensen 1924**

Eckhard Lauer

1975



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551907_0088

Physiologische und biochemische Untersuchungen
zur Taxonomie der Gattung Bifidobacterium

Orla-Jensen 1924

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
des
Fachbereichs Biologie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt
von
Eckhard Lauer
aus
Murnau/Obb.

November 1974



1. Berichterstatter: Prof. Dr. O. Kandler
2. Berichterstatter: Prof. Dr. K.-H. Schieffer

Tag der Einreichung der Arbeit: 9. 12. 1975

Tag der Annahme der Arbeit: 21. 1. 1975

Tag der mündlichen Prüfung: 5. 2. 1975

1.	Einleitung	1
2.	Die Bedeutung der Statistik für die Wirtschaft	2
3.	Die Aufgaben der Statistik	3
4.	Die Methoden der Statistik	4
5.	Die Ergebnisse der Statistik	5
6.	Die Anwendung der Statistik	6
7.	Die Bedeutung der Statistik für die Wirtschaft	7
8.	Die Aufgaben der Statistik	8
9.	Die Methoden der Statistik	9
10.	Die Ergebnisse der Statistik	10
11.	Die Anwendung der Statistik	11
12.	Die Bedeutung der Statistik für die Wirtschaft	12
13.	Die Aufgaben der Statistik	13
14.	Die Methoden der Statistik	14
15.	Die Ergebnisse der Statistik	15
16.	Die Anwendung der Statistik	16
17.	Die Bedeutung der Statistik für die Wirtschaft	17
18.	Die Aufgaben der Statistik	18
19.	Die Methoden der Statistik	19
20.	Die Ergebnisse der Statistik	20
21.	Die Anwendung der Statistik	21
22.	Die Bedeutung der Statistik für die Wirtschaft	22
23.	Die Aufgaben der Statistik	23
24.	Die Methoden der Statistik	24
25.	Die Ergebnisse der Statistik	25
26.	Die Anwendung der Statistik	26
27.	Die Bedeutung der Statistik für die Wirtschaft	27
28.	Die Aufgaben der Statistik	28
29.	Die Methoden der Statistik	29
30.	Die Ergebnisse der Statistik	30
31.	Die Anwendung der Statistik	31
32.	Die Bedeutung der Statistik für die Wirtschaft	32
33.	Die Aufgaben der Statistik	33
34.	Die Methoden der Statistik	34
35.	Die Ergebnisse der Statistik	35
36.	Die Anwendung der Statistik	36
37.	Die Bedeutung der Statistik für die Wirtschaft	37
38.	Die Aufgaben der Statistik	38
39.	Die Methoden der Statistik	39
40.	Die Ergebnisse der Statistik	40
41.	Die Anwendung der Statistik	41
42.	Die Bedeutung der Statistik für die Wirtschaft	42
43.	Die Aufgaben der Statistik	43
44.	Die Methoden der Statistik	44
45.	Die Ergebnisse der Statistik	45
46.	Die Anwendung der Statistik	46
47.	Die Bedeutung der Statistik für die Wirtschaft	47
48.	Die Aufgaben der Statistik	48
49.	Die Methoden der Statistik	49
50.	Die Ergebnisse der Statistik	50
51.	Die Anwendung der Statistik	51
52.	Die Bedeutung der Statistik für die Wirtschaft	52
53.	Die Aufgaben der Statistik	53
54.	Die Methoden der Statistik	54
55.	Die Ergebnisse der Statistik	55
56.	Die Anwendung der Statistik	56
57.	Die Bedeutung der Statistik für die Wirtschaft	57
58.	Die Aufgaben der Statistik	58
59.	Die Methoden der Statistik	59
60.	Die Ergebnisse der Statistik	60
61.	Die Anwendung der Statistik	61
62.	Die Bedeutung der Statistik für die Wirtschaft	62
63.	Die Aufgaben der Statistik	63
64.	Die Methoden der Statistik	64
65.	Die Ergebnisse der Statistik	65
66.	Die Anwendung der Statistik	66
67.	Die Bedeutung der Statistik für die Wirtschaft	67
68.	Die Aufgaben der Statistik	68
69.	Die Methoden der Statistik	69
70.	Die Ergebnisse der Statistik	70
71.	Die Anwendung der Statistik	71
72.	Die Bedeutung der Statistik für die Wirtschaft	72
73.	Die Aufgaben der Statistik	73
74.	Die Methoden der Statistik	74
75.	Die Ergebnisse der Statistik	75
76.	Die Anwendung der Statistik	76
77.	Die Bedeutung der Statistik für die Wirtschaft	77
78.	Die Aufgaben der Statistik	78
79.	Die Methoden der Statistik	79
80.	Die Ergebnisse der Statistik	80
81.	Die Anwendung der Statistik	81
82.	Die Bedeutung der Statistik für die Wirtschaft	82
83.	Die Aufgaben der Statistik	83
84.	Die Methoden der Statistik	84
85.	Die Ergebnisse der Statistik	85
86.	Die Anwendung der Statistik	86
87.	Die Bedeutung der Statistik für die Wirtschaft	87
88.	Die Aufgaben der Statistik	88
89.	Die Methoden der Statistik	89
90.	Die Ergebnisse der Statistik	90
91.	Die Anwendung der Statistik	91
92.	Die Bedeutung der Statistik für die Wirtschaft	92
93.	Die Aufgaben der Statistik	93
94.	Die Methoden der Statistik	94
95.	Die Ergebnisse der Statistik	95
96.	Die Anwendung der Statistik	96
97.	Die Bedeutung der Statistik für die Wirtschaft	97
98.	Die Aufgaben der Statistik	98
99.	Die Methoden der Statistik	99
100.	Die Ergebnisse der Statistik	100

Für Herta

Inhaltsverzeichnis

Seite:

I.	Einleitung	1
1.	Zur Geschichte der Taxonomie der Bifidobakterien	1
2.	Merkmale und Eigenschaften	6
2.1.	Beziehung zum Sauerstoff	6
2.2.	Ernährungsansprüche und Morphologie	7
2.3.	Gärungsmechanismus und Gärungsprodukte	9
2.4.	Vergärung verschiedener Kohlenhydrate. "Bunte Reihe"	11
2.5.	Zellwandzusammensetzung	12
2.6.	Basenzusammensetzung der DNS	13
2.7.	DNS-Homologie	13
3.	Untersuchungsziele der vorliegenden Arbeit	14
II.	Material und Methoden	15
1.	Organismen	15
2.	Nährmedien, Kultivierung und Stammhaltung	20
3.	Messung des Wachstums	23
4.	Zellen-Ernte	23
5.	Aufschluß der Zellen. Gewinnung von Zellwänden und zellfreien Extrakten	23
6.	Reinigung und Hydrolysebedingungen der Zellwände	24
6.1.	Reinigung	24
6.2.	Hydrolysebedingungen	24
7.	Qualitative und quantitative Untersuchungen der Zellwandzusammensetzung	24
7.1.	Qualitative, papierchromatographische Auftrennung der hydrolysierten Zellwände	24
7.2.	Qualitative und quantitative Analyse der Aminosäuren und -Zucker mit dem Beckman-Analysator	25

7.3.	Fingerprint-Analyse der Aminosäuresequenz des Mureins	25
8.	Enzymatische Untersuchungen an zellfreien Extrakten	26
8.1.	Reagentien, Lösungen und Puffer	26
8.2.	Enzymtests	26
8.2.1.	FDP-aktivierte, NAD-abhängige L-LDH	27
8.2.2.	FDP-Aldolase	28
8.2.3.	Glukose-6-P- und 6-P-Glukonat-Dehydrogenase	29
8.2.4.	Fruktose-6-P-Phosphoketolase	30
8.3.	Proteinbestimmung	32
8.4.	Molekulargewichtsbestimmung der LDH	32
9.	Anreicherung der LDH	32
9.1.	Anreicherungs-schritte	33
10.	Disc-Elektrophorese	34
10.1.	Lösungen zum Sichtbarmachen der LDH- Positionen	35
10.2.	Auswertung	36
11.	Untersuchungen zur Gärungsphysiologie	36
11.1.	Glukose-Vergärung durch ruhende Kulturen im Puffer	36
11.2.	Vergärung durch wachsende Kulturen in Me- dium III	37
11.2.1.	Kultivierung	37
11.2.2.	Radiochemikalien	37
11.2.3.	Vergärung von uniform- und positionsmarkierter Glukose	38
11.3.	Enzymatische Bestimmung von Glukose und Gärungsprodukten	38
11.4.	Isolierung der Gärungsprodukte	39
11.4.1.	Auftrennung der löslichen Fraktion	39
11.4.2.	Säulenchromatographische Trennung der Säuren	41
11.5.	Messung der Radioaktivität	42

III.	Ergebnisse	43
1.	Untersuchungen der Zellwandzusammensetzung	43
1.1.	Murein	43
1.2.	Zellwandpolysaccharide und -Teichonsäuren	51
2.	Nachweis und Charakterisierung verschiedener Enzyme des katabolischen Stoffwechsels der Bifidobakterien	56
2.1.	Die NAD-abhängige, FDP-regulierte L-LDH	56
2.1.1.	Allgemeine Charakterisierung	57
2.1.1.a	Einfluß von Phosphat auf die Stabilität	57
2.1.1.b	Hitzestabilität	61
2.1.1.c	pH-Optimum für die Aktivität	62
2.1.1.d	Abhängigkeit der spezifischen Aktivität von der Proteinkonzentration	63
2.1.2.	Anreicherung	64
2.1.3.	Allosterische Eigenschaften	65
2.1.3.a	Der Einfluß von Pyruvat	66
2.1.3.b	Der Einfluß von FDP	71
2.1.3.c	Wirkung von FDP und Pyruvat auf die scheinbare Affinität für Pyruvat bzw. FDP	77
2.1.3.d	Quartärstruktur	79
2.1.4.	Kompetitive Hemmung durch Phosphat	79
2.1.5.	Förderung durch zweiwertige Kationen	81
2.1.5.a	Die optimale Mg^{++} -Konzentration	82
2.1.5.b	Abhängigkeit vom pH-Wert	82
2.1.5.c	Vergleich des Einflusses verschiedener Kationen auf die L-LDH von B.pseudolongum und anderen Milchsäurebakterien	86
2.1.6.	Elektrophoretische Mobilität im Polyacrylamid-Gel	88
2.2.	FDP-Aldolase	88
2.3.	Hexosemonophosphat-Dehydrogenasen	93
2.4.	Fruktose-6-P-Phosphotekolase	94

3.	Versuche zum Mechanismus der Variation der Gärungsprodukte	95
3.1.	Das Verhältnis Azetat zu Laktat während des Wachstums verschiedener Stämme	96
3.2.	Die C ¹⁴ -Verteilung auf die Gärungsprodukte nach Kultivierung mit verschieden positionsmarkierter Glukose	99
3.3.	Die Artspezifität des Quotienten Azetat/Laktat	102
4.	Untersuchung des Spektrums vergärbare Kohlenhydrate	104
IV.	Schlußbetrachtung	110
1.	Beziehung der Gattung Bifidobacterium zu den Familien Corynebacteriaceae, Actinomycetaceae und Lactobacillaceae	111
1.1.	Corynebacteriaceae	111
1.2.	Actinomycetaceae	112
1.3.	Lactobacillaceae	114
2.	Neugliederung der Gattung Bifidobacterium Orla-Jensen (1924) aufgrund der erarbeiteten Daten	116
2.a	B.bifidum	118
2.b	B.breve, B.parvulorum, B.infantis und B.liberorum	118
2.c	B.asteroides	119
2.d	B.lactentis, A.parabifidus, B.longum var. longum, B.longum var.animalis	120
2.e	B.suis	122
2.f	B.animalis	123
2.g	B.spec.P 6, B.spec. B 618	123
2.h	B.pseudolongum, B.globosum	124
2.i	B.magnum	124
2.j	B.spec.B 676, B 684, F 44, F 144 und F 171	125
2.k	B.spec.F 392	125
2.l	B.adolescentis, B.dentium, B.catenulatum, B.angulatum, B.appendicitis und A.eriksonii	126

2.m	B.spec.F 395	127
2.n	B.indicum, B.coryneforme	127
2.o	B.thermophilum, B.ruminale	128
V.	Zusammenfassung	129
VI.	Literaturverzeichnis	133

Abkürzungen:

A.	Actinomyces
ADP	Adenosin-di-Phosphat (analog ATP)
Ala	Alanin
Asc	Ascorbat
Asp	Asparaginsäure
AspNH ₂	Asparagin
ATP	Adenosin-tri-Phosphat
B.	Bifidobacterium
Cys	Cystein
ΔE	Extinktionsänderung
EMP	Embden-Meyerhof-Parnas
F-1-P	Fructose-1-Phosphat (analog F-6-P, e.t.c.)
FDP	Fructose-1,6-di-Phosphat
g ₀	Erdbeschleunigung
Glc	Glukose
GlcNH ₂	Glukosamin
Glu	Glutaminsäure
GluNH ₂	Glutamin
Gly	Glycin
HMP	Hexosemonophosphat
K _M	Michaelis-Menten-Konstante

L.	Lactobacillus
LDH	Laktat-Dehydrogenase
Lys	Lysin
M	Mol/Liter, analog: mM = 10^{-3} M/Liter, e.t.c.
Mur	Muraminsäure
NAc-	N-Azetyl-
NAD	Nicotinamid-adenin-dinucleotid (freie Säure)
NADH	reduzierte Form von NAD
NADP	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat
Orn	Ornithin
P _i	Orthophosphat
Sc.	Streptococcus
Ser	Serin
ssp.	subspecies
St.	Staphylococcus
syn.	synonymum
Thr	Threonin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (internationale Enzymeinheit) = 1 µM/min
V	enzymatisch katalysierte Umsatzgeschwindigkeit pro Volumen = U/ml
var.	varietatis (Varietät einer Spezies)
V _m	maximale Umsatzgeschwindigkeit
% V _m	gemessene Umsatzgeschwindigkeit im Verhältnis zu V _m (%) bzw. Liganden-Sättigungsgrad des Enzyms

I. Einleitung

1) Kurzer geschichtlicher Abriß der taxonomischen Erforschung der Bifidobakterien.

Seitdem Tissier (1900) seinen "*Bacillus bifidus communis*" aus dem Stuhl des Brustkindes isolierte, ist viel über diese häufig verzweigten Gram-positiven Stäbchen gearbeitet worden. Nicht nur aus dem Darm von Menschen sondern auch von Tieren (Jacobson, 1909; De Gasperi, 1911; Bertrand, 1913; Hull und Rettger, 1917) wurden solche anaeroben, bifiden Keime seit der Jahrhundertwende isoliert.

Leider krankte die fundierte Erforschung der Bifidobakterien immer wieder an voreiligen Schlußfolgerungen, die vielfach auf Spekulationen über die ernährungsphysiologische und immunbiologische Bedeutung dieser Keime vor allem in pädiatrischer Hinsicht beruhten, aber sich auf zu wenige eingehend untersuchte Merkmale stützten. Die Entwicklung einer klaren Einteilung der Bifidobakterien wurde ferner durch ungenügende Züchtungsbedingungen und allzu einseitige Berücksichtigung

der morphologischen und kulturellen Eigenschaften behindert. Einen eingehenden geschichtlichen Überblick über die wichtigsten Stufen der taxonomischen Bearbeitung der Bifidobakterien gaben kürzlich Poupard et al. (1973).

Schon 1924 schlug Orla-Jensen den heute anerkannten Gattungsnamen *Bifidobacterium* vor. Statt dieses Namens kursierte aber in den ersten vier Auflagen von Bergey's Manual die sehr fragwürdige Bezeichnung *Bacteroides bifidus* nach Castellani und Chalmers (1919) und in der 5. Auflage die von Holland (1920) vorgeschlagene Klassifikation als *Lactobacillus bifidus*. Etwa ab 1930 glaubten dagegen einige Untersucher an enge Beziehungen zu Actinomyceten.

Eggerth erkannte 1935, daß die aus Menschendarm isolierten Bifidobakterien auf Grund der Vergärung von Arabinose, Xylose, Melezitose und Mannose wenigstens in zwei Gruppen einzuteilen sind. Auch Weiss und Rettger (1938) sprachen von zwei Typen des *Lactobacillus bifidus*. Typ I, den sie *L.bifidus* nannten, sollte nach längerer Kultur unverzweigte Stäbchen bilden, auch aerob wachsen und eine Variante von *L.acidophilus* sein, während Typ II verzweigt war, nur anaerob wuchs und als *L.parabifidus* bezeichnet wurde. Norris et al. (1950) vermehrten die Verwirrung noch durch die Behauptung, daß die unverzweigte Form aus der verzweigten entsteht und daher, gerade entgegengesetzt zur Auffassung von Weiss und Rettger (1938), die verzweigte Form *L.bifidus* und die unverzweigte *L.parabifidus* genannt werden müßte. In späteren Untersuchungen (Gyllenberg, 1955; 1958; Poupard et al., 1973) konnte gezeigt werden, daß es sich bei solchen "Umwandlungen" tatsächlich nur um Entmischungen verunreinigter Kulturen handelte.

Prévot ordnete 1938 die Bifidobakterien als Gattung *Bifidobacterium* zusammen mit den Gattungen *Actinobacterium* und

Corynebacterium in die Familie Actinomycetaceae ein. Erstmals werden sechs Spezies, wenn auch lückenhaft beschrieben, aufgeführt.

Der Spezies *B. bifidum* legte er den Originalstamm Tissiers zugrunde. Bei den übrigen Arten waren keine authentischen Stämme mehr verfügbar, und daher wurde bei *B. appendicitis* (Lotti, 1909), *B. constellatum* (White, 1921), *B. intestinalis* (Jacobson, 1909), *B. cornutum* (Distaso, 1912), *B. bifurcatum* (Choukévitch, 1911) nur die Erstbeschreibung übernommen, ohne daß ein Typus oder Neotypus vorlag.

Prevot (1961) wandelte später die Gattung *Bifidobacterium* zu einer Untergattung der Gattung *Actinobacterium* um. Hierbei ist auch erstmalig von sieben nicht näher bezeichneten Neuisolaten der Spezies *B. appendicitis* die Rede. Drei dieser Stämme wurden später auch in anderen Labors untersucht.

Nach Werner und Seeliger (1964) war der Stamm 1535 B mit Dehnerts Biotyp 5 (*B. longum* Reuter) identisch, während sich der Stamm 1620E als Biotyp 1 (*B. bifidum* (Tissier) Orland-Jensen) erwies. Beide Stämme sind nicht mehr verfügbar, während ein dritter Stamm 1835, der von Scardovi und Trovatelli (1965) und von Moore (pers.Mitt. 1973) untersucht worden war, als VPI 4343 (Blacksburg, Virginia) erhalten blieb. Dieser und zwei weitere, aber erst nach 1960 (Scardovi, pers.Mitt., 1972) isolierte Stämme (2727B, 3859) sind nach neueren Untersuchungen nicht von *B. adolescentis* Reuter zu unterscheiden (Mitsuoka, 1969; Scardovi und Trovatelli, 1965; Scardovi, pers.Mitt., 1972; Moore, pers.Mitt., 1973). Aufgrund der genannten Untersuchungen kann man *B. appendicitis* nicht als definierte Art betrachten.

Ungeachtet des Vorschlags von Prevot (1938), innerhalb der Familie Actinomycetaceae die Gattungen *Bifidobacterium*,

Actinobacterium und Corynebacterium zu unterscheiden, wollte von Plotho (1947/48) die Bifidobakterien als Proaktinomyceten einordnen, wohingegen Olsen (1949) und Boventer (1949) sich für eine Einordnung bei den Corynebakterien entschieden.

Pine und Howell (1956) wiesen schließlich auf gärungsphysiologische Unterschiede zwischen Actinomyceten und Bifidobakterien hin. Sie erkannten, daß letztere mehr Essigsäure als Milchsäure, Actinomyceten dagegen hauptsächlich Milchsäure aus Glukose bilden. Trotzdem wurde einer der untersuchten Stämme, *Lactobacillus bifidus*, Stamm Timberlain, der von Norris et al. (1950) aus dem Darm eines Erwachsenen isoliert worden war, mit der Bezeichnung *Actinomyces parabifidus* (Pine und Georg, 1965) bei der ATCC hinterlegt.

22 Jahre nach Eggerth (1935) erweiterte Dehnert (1957) die Anzahl der bekannten Biotypen aus dem Darm des Brustkindes auf insgesamt vier, indem er Eggerths Gruppe I anhand des Spektrums der Kohlenhydratvergärung aufgliederte. Diese provisorische Einteilung wurde in einer Reihe von Untersuchungen durch Werner und Seeliger (1962 bis 1964) beibehalten. Eine größere Anzahl von Stämmen verschiedener Herkunft, auch der Originalstamm von Tissier, ließ sich gut einordnen. Dagegen erwiesen sich zwei als *L. bifidus* bezeichnete Stämme, die durch Malyoth und Bauer (1950) als sogenannte "smooth"- und "mucoid"-Varianten beschrieben und bei der ATCC hinterlegt worden waren, nicht als Bifidobakterien, sondern als eng verwandt mit der Untergattung *Streptobacterium*. Im Gegensatz zu Bifidobakterien bilden sie nämlich ausgeprägte Ketten, können bei 15°C wachsen, kommen unter relativ aeroben Bedingungen gut zur Entwicklung und weisen ein anders geartetes Spektrum der Kohlenhydratvergärung auf. Nach eigenen Untersuchungen (unveröffentlicht) wird außerdem aus Glukose nur Milchsäure gebildet. Es handelt sich um Stämme von *Lactobacillus curvatus*.

Reuter (1964) kam aufgrund eingehender Untersuchungen an zahlreichen Neuisolaten aus dem Darm von Brustkindern und Erwachsenen zu einer ersten klaren Vorstellung über das Genus *Bifidobacterium*. Er prüfte das Spektrum der Kohlenhydratvergärung und die serologischen Beziehungen der Stämme. Anhand der physiologischen Merkmale schlüsselte er die Dehnertschen Biotypen weiter auf und beschrieb acht Arten: *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. liberorum*, *B. parvulorum*, *B. breve*, *B. lactentis*, *B. longum* und *B. adolescentis*. 1971 benannte er jeweils auch einen Typstamm, der bei der ATCC hinterlegt wurde.

Die in der neu erscheinenden 8. Auflage von Bergey's Manual als Arten bezeichneten, aus dem Darm des Menschen isolierten Stämme *B. bifidum*, *B. breve* (syn. *B. parvulorum*), *B. infantis* (syn. *B. liberorum*, syn. *B. lactentis*), *B. longum* und *B. adolescentis* entsprechen ziemlich eindeutig den von Dehnert (1957) unterschiedenen Biotypen I, III, IV und V aus dem Darm des Brustkindes, wobei nur *B. adolescentis*, der nach Reuter (1964) der dominierende Keim der Bifidusflora des Erwachsenen ist, von Dehnert nicht gefunden worden war. Mit *B. dentium* wurde erst kürzlich von Scardovi und Crociani (1974) eine weitere Art aufgestellt, die in der Mundhöhle und bei kariösen Zähnen häufig vorkommt und phänotypisch *B. adolescentis* gleicht.

Nicht nur aus dem Darm des Erwachsenen sondern auch aus Abwasser - einem Sekundärstandort - wurden weitere von Scardovi und Crociani (1974) als *B. catenulatum* und *B. angulatum* bezeichnete Arten isoliert. Wie *B. dentium* sind sie phänotypisch kaum von *B. adolescentis* zu unterscheiden. Ausschließlich aus Abwasser wurden vereinzelt noch weitere Keime isoliert, die von Scardovi und Trovatelli (1974) bisher lediglich als die Gruppen "subtile" und "minimum" bezeichnet werden. Die Zahl der beschriebenen Arten nahm weiter zu, als die Flora im Intestinaltrakt von Tieren genauer untersucht wurde. Aus Tierfaeces und aus Rinder- sowie Schafpansen stammen die von

Mitsuoka (1969) beschriebenen Arten B. pseudolongum und B. thermophilum, die den beiden kurz darauf von Scardovi et al. (1969) beschriebenen Arten B. globosum und B. ruminale ähneln (Scardovi et al., 1971). 1969 erschienen außerdem noch die Beschreibungen der von Scardovi und Trovatelli (1969) aus Bienen isolierten Arten B. asteroides, B. indicum und B. coryneforme. Aus Schweinefaeces stammt die von Matteuzzi et al. (1971) beschriebene Art B. suis. Kaninchenfaeces war der Fundort der Art B. magnum (Scardovi und Zani, 1974), einer Spezies mit auffallend großen Zellen. In der Faeces von Ratten, Kücken und anderen Tieren wurde sowohl von Mitsuoka (1969) als auch von Scardovi und Trovatelli (1974) Keime der Art B. animalis gefunden. Während aber Mitsuoka darin eine für Tiere typische Variante der aus Menschendarm stammenden Art B. longum (var. animalis) sah, erhoben sie Scardovi und Trovatelli (1974) zur eigenen Art.

Die Arbeiten der letzten 10 Jahre haben damit die ursprüngliche, recht verschwommene Art L. bifidus in eine gut gegliederte Gattung Bifidobacterium verwandelt. Dehnert und Reuter hatten eine neue Ära der taxonomischen Erforschung der Bifidobakterien begründet, gekennzeichnet durch eine immer stärkere Verknüpfung traditioneller bakteriologischer Methodik mit vergleichender Biochemie. Die bessere Kenntnis der Eigenschaften und die Einbeziehung neuer Merkmale hatte immer wieder eine Revision des bestehenden Klassifikationschemas ermöglicht, und diese Entwicklung ging parallel mit der Auffindung neuer Biotypen.

2) Merkmale und Eigenschaften der Bifidobakterien.

2.1. Beziehung zum Sauerstoff.

Es war seit langem bekannt, daß Bifidobakterien nur strikt anaerob wachsen. Die Hemmung durch O_2 nimmt aber bei manchen Stämmen nach mehreren Passagen auf künstlichen Medien ab. Auch die Ursache der O_2 -Empfindlichkeit kann bei den einzelnen

Stämmen unterschiedlich sein. So konnten de Vries und Stouthamer (1969) drei Typen unterscheiden:

Typ 1 (z.B. *B. parvulorum* S 50) vermag in belüfteten Flüssigkeitskulturen zu wachsen, denn Stämme dieses Typs besitzen entweder schwache Katalase-Aktivität oder - wie im Fall von *B. parvulorum* - einen unbekannten H_2O_2 -spaltenden Mechanismus, so daß es zu keiner Anreicherung von H_2O_2 kommt.

Typ 2 (z.B. *liberorum* S 76 e) bildet bei Belüftung des Mediums wachstumshemmende Konzentrationen an H_2O_2 und stirbt ab.

Typ 3 (z.B. *B. adolescentis*) wächst nur in Anwesenheit von Ascorbat oder Cystein und kann den Farbstoff Neutralrot reduzieren. Bei Belüftung wird das Wachstum sofort eingestellt, da das Redoxpotential des Mediums zu hoch ist. H_2O_2 wird nicht angereichert.

2.2. Ernährungsansprüche und Morphologie.

Bifidobakterien unterscheiden sich deutlich von Laktobazillen hinsichtlich der Ernährungsansprüche. Während für letztere generell mehrere Aminosäuren essentiell sind, können erstere zum Teil auch mit Ammoniumsalzen als einziger Stickstoffquelle wachsen (Hassinen et al., 1951; Scardovi et al., 1969). In solchen Fällen wurde Cystein als einzige Aminosäure nur noch zur Verbesserung der anaeroben Bedingungen zugesetzt.

Der Bedarf an Wuchsstoffen ist bei einzelnen Arten der Bifidobakterien recht verschieden (Tab.1). Während alle bisher untersuchten Vertreter Pantothenat bzw. Pantethin und meistens auch Riboflavin benötigen, unterscheiden sie sich hinsichtlich des Bedarfs weiterer Vitamine, wie Biotin, Nicotinsäure, Thiamin, Pyridoxin und Folsäure. Purin- und Pyrimidin-Basen (PPB) sowie N-Azetylglucosamin (N-Ac) wurden

nur von *B. bifidum* var. *pennsylvanicum* zum Wachstum benötigt (Sundman et al. 1959). Eine Übersicht über den Minimalbedarf aller heute bekannten Arten ist noch nicht verfügbar.

Tab.1: Der Wuchsstoffbedarf einiger Bifidobakterien (nach Sundman et al. (1959), Scardovi et al. (1969), Scardovi und Trovatelli (1969).

Spezies	Wuchsstoffbedarf ⁺)								
	Biotin	Nicotinsäure	Thiamin	Riboflavin	Pyridoxin	Pantothenat	Pantethelin	Folsäure	PPB ⁺⁺)
<i>B.bifidum</i> var. <i>pennsalvanic</i> .				+			+		+
<i>B.breve</i>				+			+		
<i>B.infantis</i> (syn. <i>B.liberor</i> .)	+					+			
<i>B.longum</i>				+			+		
<i>B.asteroides</i>	+	+	+	+	+	+			
<i>B.thermophilum</i>			+	+		+		+	
<i>B.pseudolongum</i>			+	+		+		+	

⁺) + = Wuchsstoff wird benötigt,

⁺⁺) PPB = Purin- und Pyrimidinbasen,

⁺⁺⁺) N-Ac = N-Azetyl- und andere N-substituierte Glukosaminverbindungen (Lambert und Zilliken, 1965).

Zwischen Ernährung und Morphologie bestehen bei Bifidobakterien komplexe Zusammenhänge (Sundman und Björkstén, 1958; Sundman et al., 1959). Auf künstlichen Medien neigen viele Stämme je nach Befriedigung des Wuchsstoffbedarfs zu mehr oder minder stark verzweigten Formen, während im natürlichen Biotop Verzweigungen selten zu beobachten sind (Petuely und Eichler, 1954).

B. bifidum var. *pennsylvanicum* (György et al., 1954) Werner und Seeliger (1964), der nur mit Zusatz von Muttermilch zu wachsen vermag, zeigte nach Zugabe von N-Azetyl-Glukosamin zum Medium eine Normalisierung des Wachstums (vgl. Tab. 1) und der Zellteilung (Glick et al., 1960). Versuche mit markierten, N-substituierten Glukosamin-Derivaten ergaben, daß diese tatsächlich in die Zellwand eingebaut werden (O'Brien et al., 1960; Lambert et al., 1965), deren wesentliche formgebende Komponente, das Murein, zu einem großen Teil aus solchen Verbindungen aufgebaut ist. Bei anderen Arten konnte jedoch keine Normalisierung der Zellteilung mit Hilfe von N-Azetyl-Glukosamin erreicht werden. So beobachteten Kojima et al. (1968, 1970) bei einigen Stämmen eine morphologische Umwandlung der Zellen vom bifid-verzweigten zum bazillöid-regulären Zustand nach Zugabe von Ca^{++} , während Husain et al. (1972) ähnliche Einflüsse durch Serin, Glutaminsäure, Alanin oder Asparaginsäure feststellten. Offenbar sind diese modifizierenden Effekte auf die Morphologie sehr komplexer Natur und noch weitgehend unverstanden.

2.3. Gärungsmechanismus und Gärungsprodukte.

Während bei Laktobazillen der Gärungsmechanismus schon lange bekannt ist, wurde er bei Bifidobakterien erst 1964 unabhängig nacheinander von Scardovi (1964), de Vries und Stouthamer (1967) und Veerkamp (1969) aufgeklärt. Wie bei dem schon früher durch Schramm et al. (1956) untersuchten *Acetobacter xylinum* konnte bei Bifidobakterien im zellfreien Extrakt das Enzym Fruktose-6-Phosphat-Phosphoketolase nachgewiesen werden, durch welches das Intermediärprodukt Fruktose-6-Phosphat in Anwesenheit von Phosphat zu Azetylphosphat und Erythrose-4-Phosphat gespalten wird. Die tatsächliche Bedeutung dieses Enzyms wurde auch durch den Nachweis von Transaldolase und Transketolase untermauert, da hierdurch Erythrose-4-Phosphat und Fruktose-6-Phosphat zu 2 Mol Pentose-5-Phosphat umgewandelt werden können. Außerdem

fand sich auch eine Xylulose-5-Phosphat-Phosphoketolase, die das intermediär über Isomerase- und Epimerase-Reaktionen oder direkt entstandene Xylulose-5-Phosphat in Anwesenheit von Orthophosphat in Azetylphosphat und Glyceraldehyd-3-Phosphat abbaut. Wie weiter gezeigt werden konnte, wird Triosephosphat nicht wie bei *Acetobacter xylinum* über Aldolase zu Fruktose-1,6-di-Phosphat zurückverwandelt und nach Dephosphorylierung über Fruktose-6-Phosphat erneut in den Pentosephosphat-Weg eingeschleußt, sondern es wird wie bei der Glykolyse zu Pyruvat oxidiert. Ausgehend von 2 Mol Fruktose-6-Phosphat entstehen insgesamt 3 Mol Azetat und 2 Mol Triosephosphat, das nach der Oxidation zu Pyruvat zu 2 Mol L-Laktat reduziert wird (siehe Abb. 1).

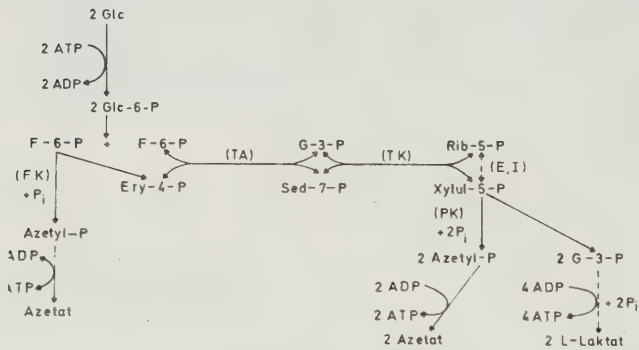


Abb.1: Schema des Glukoseabbaus durch Bifidobakterien (Bifidoshunt).

Abkürzungen:

P_i = Orthophosphat,
 ATP, ADP = Adenosin-tri-, -di-Phosphat,
 Glc = Glukose, Glc-6-P = Glukose-6-Phosphat,
 F-6-P = Fruktose-6-Phosphat, analog: Azetyl-P,
 Ery-4-P (Erythrose-), Sed-7-P (Sedoheptulose-),
 G-3-P (Glyceraldehyd-), Rib-5-P (Ribose-),
 Xylul-5-P (Xylulose-).
 (FK) = F-6-P-Phosphoketolase,
 (PK) = Xylul-5-P-Phosphoketolase,
 (TA) = Transaldolase, (TK) = Transketolase,
 (E,I) = Pentose-5-P-Epimerase, -Isomerase.

Sowohl Kuhn und Tiedemann (1953) als auch Scardovi und Trovatelli (1965) berichteten ursprünglich über das Vorkommen von Aldolase bei Bifidobakterien, doch erhielten diese Befunde keine weitere Bestätigung (de Vries und Stouthamer, 1967; London und Kline, 1973).

In den zellfreien Extrakten konnte 6-Phosphoglukonat-Dehydrogenase (Scardovi et al., 1969 bis 1974) nachgewiesen werden, dagegen nur vereinzelt auch Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (Scardovi et al. 1969 bis 1974; de Vries und Stouthamer 1967; de Vries et al. 1967), so daß eine Beteiligung des Hexose-monophosphatwegs am Glukoseabbau nicht wahrscheinlich war (Scardovi et al. 1969). Durch den Einsatz von C-1- bzw. C-6-C¹⁴-markierter Glukose konnte die ausschließliche Beteiligung des "Bifidoshunts" beim Glukoseabbau der Bifidobakterien gezeigt werden (Scardovi, 1964; Scardovi et al., 1969; Scardovi und Trovatelli, 1969; Veerkamp, 1969). Nach Vergärung von C-1-C¹⁴-markierter Glukose befindet sich die Markierung in der Methylgruppe des Azetats, während markierte Milchsäure nur nach Einsatz von C-6-C¹⁴-markierter Glukose entsteht.

Als weiteres Enzym wurde bei Bifidobakterien eine NAD-abhängige, allosterisch durch FDP (Fruktose-1,6-di-Phosphat) regulierte L-LDH nachgewiesen (de Vries et al., 1967; de Vries und Stouthamer, 1968; Veerkamp, 1969). Die zur Aktivierung erforderliche Menge an FDP entsteht über Phosphofruktokinase, deren Aktivität in zellfreien Extrakten gezeigt werden konnte (de Vries et al., 1967; Veerkamp, 1969).

2.4. Vergärung verschiedener Kohlenhydrate. "Bunte Reihe".

Das Spektrum vergärbarer Kohlenhydrate diente auch bei Bifidobakterien seit jeher als Klassifikationsgrundlage. Die aus dem Darm des Menschen isolierten Stämme ließen sich auf diese Weise recht gut in Gruppen bzw. Arten aufgliedern, so wie es bei Eggerth, Dehnert, Reuter und Mitsuoka geschah.

Andere Merkmale, die ebenso wie die Bunte Reihe zur klassischen Artdifferenzierung herangezogen werden, wie beispielsweise Bildung von NH_3 aus Arginin, Nitratreduktion, H_2S - und Indolbildung sowie Katalase-Aktivität, konnten nicht wesentlich zur Artdifferenzierung beitragen, da Bifidobakterien hinsichtlich dieser Merkmale in der Regel negativ sind.

Allerdings können einige Arten oder Stämme nach Kultivierung in Gegenwart von Nitrat und lysierten Erythrozyten Nitrat reduzieren (van der Wiel-Korstanje und De Vries, 1972).

2.5. Zellwandzusammensetzung.

Die Primärstruktur des Mureins (Peptidoglycan) hat sich bei den gram-positiven Bakterien als ein bedeutsames Merkmal erwiesen (Kandler, 1967; Schleifer und Kandler, 1972). So ergab sich auch bei Bifidobakterien eine gute Übereinstimmung zwischen der Mureinzusammensetzung und der auf physiologischen Merkmalen beruhenden Arteinteilung nach Reuter (1963). Die bisher gefundenen Mureintypen lassen außerdem eine nähere Beziehung zu Laktobazillen als zu Actinomyceten vermuten (Koch, 1969). Pine (1970) hatte dagegen den Befund, daß bei Actinomyceten wie bei Bifidobakterien Lysin und Ornithin gemeinsam im Murein vorkommen, als Bestätigung einer näheren Verwandtschaft dieser beiden Keimgruppen gewertet.

Auch die Zuckerzusammensetzung des Zellwandpolysaccharids hat artspezifischen Charakter. Bei Bifidobakterien ist regelmäßig Galaktose, meistens auch Glukose und häufig Rhamnose, in einigen Fällen außerdem noch 6-Desoxytalose am Aufbau der Polysaccharide beteiligt (Koch, 1969). Während bei *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. breve*, *B. parvulorum* und *B. liberorum* Glukose, Galaktose und Rhamnose gemeinsam am Aufbau des Polysaccharids beteiligt sind, fehlt bei *B. adolescentis* meistens Rhamnose. Bei *B. longum* ergaben sich vier Stammgruppierungen, die möglicherweise bei der Unterscheidung von Unterarten bedeutsam

werden könnten. Bei einer Gruppe ist Glukose, Galaktose und Rhamnose vorhanden, während bei einer weiteren Gruppe Rhamnose fehlt. Bei zwei weiteren Gruppen kommt Glukose nur in Spuren vor. Sie unterscheiden sich jedoch durch das Vorkommen von 6-Desoxytalose.

Teichonsäuren sind nur selten am Aufbau der Zellwand der Bifidobakterien beteiligt. Der Phosphatgehalt der tryptisch gereinigten Zellwände liegt meistens unter 2,5 %. Nur bei einzelnen Stämmen von *B. bifidum* und *B. adolescentis* ergaben sich Werte von fast 5 %. In diesen Fällen konnte auch Glycerin, jedoch nicht Ribit als Zellwandbestandteil nachgewiesen werden (Koch, 1969). Dieses Merkmal könnte eventuell bei der Unterscheidung von Unterarten nützlich sein.

2.6. Basenzusammensetzung der DNS.

Die Basenzusammensetzung der DNS von Bifidobakterien wurde recht eingehend untersucht (Sebald et al., 1965; Werner et al., 1966; Gasser und Mandel, 1968; Scardovi et al., 1969 bis 1974; Mitsuoka et al., 1974). Der molare (G+C)%-Gehalt der DNS liegt bei den meisten Arten knapp um 60, bei *B. pseudolongum* bei etwa 64 und bei *B. catenulatum* bei 54. Dieser Bereich ist deutlich höher als bei der Gattung *Lactobacillus* (Bereich: 30 bis 53, Laskin und Lechevalier, 1973), so daß auf dieser Basis eine gute Unterscheidungsmöglichkeit zwischen *Lactobacillus* und *Bifidobacterium* vorliegt. Gegenüber der Gattung *Actinomyces* und *Corynebacterium* ist dagegen aufgrund der ähnlichen Basenzusammensetzung keine gute Trennung möglich.

2.7. DNS-Homologie.

Der "Grad" der verwandtschaftlichen Beziehungen der Bakterien drückt sich in der DNS-Homologie aus. Ausführliche Untersuchungen an Bifidobakterien zeigten, daß die einer Art angehörenden Stämme relativ hohe DNS-Homologie von über 60 %

aufweisen, während zwischen verschiedenen Arten nur geringe Homologie von höchstens 35 % auftritt (Scardovi et al., 1970, 1971, 1974). Zwischen einigen Arten von Bifidobakterien ergab sich allerdings hohe Homologie, so daß sich hiermit ein wesentliches Argument ergab, diese Arten zu einer Art zusammenzufassen und die betreffenden Artnamen als synonym zu bezeichnen: *B. infantis* (Syn. *B. lactensis*, Syn. *B. liberorum*), *B. breve* (Syn. *B. parvulorum*), *B. thermophilum* (Syn. *B. ruminale*), *B. pseudolongum* (Syn. *B. globosum*) und *B. indicum* (Syn. *B. coryneforme*).

3.) Untersuchungsziele der vorliegenden Arbeit.

Die Ziele der vorliegenden Untersuchungen waren es, die Merkmale der bisher beschriebenen Arten mit einheitlicher Methodik zu überprüfen und zu vervollständigen, sowie insbesondere die Kenntnis der neueren, biochemischen Merkmale wie Zellwandzusammensetzung und Eigenschaften von Enzymen zu vertiefen.

Dieses Material sollte dazu genützt werden, die Berechtigung der Aufstellung der zahlreichen Arten zu überprüfen und zur Synonymie Stellung zu nehmen.

II. Material und Methoden

1. Organismen

Tab.2.: Herkunft und Bezeichnung der untersuchten Stämme.

Stammbezeichnung ⁺)	Fundort ⁺)	Herkunft/Neubezeichnung
B.bifidum E 319 f	2	Reuter
B.infantis S 12	1	Reuter
B.breve S 1	1	Reuter
B.parvulorum S 50	1	Reuter
B.liberorum S 76 e	1	Reuter
B.lactentis 659	1	Reuter
B.longum E 194 b	2	Reuter
B.adolescentis E 194 a	2	ATCC 15703
B.appendicitis 2727 B	Appendix	Moore 3808
B.appendicitis 1835	Appendix	Moore 4343
P 6	2	Beerens
A. eriksonii	Infekt	ATCC 15423
A. parabifidus 308	2	ATCC 17930

Stammbezeichnung ⁺)	Fundort ⁺)	Herkunft/Neubezeichnung
W 1	2	Lauer
W 2	2	Lauer
W 3	2	Lauer
W 4	2	Lauer
W 5	2	Lauer
Bs 6 M	2	Weiß
Bs 9 M	2	Weiß
Sl 1 a	2	Weiß
Sl 1	2	Weiß
Sl 2	2	Weiß
Sl 3	2	Weiß
Sl 4	2	Weiß
Sl 6	2	Weiß
Sl 7	2	Weiß
Sl 8	2	Weiß
Hl 3	2	Weiß
Ms 1	2	Weiß
F 1	2	Weiß
F 2	2	Weiß
F 2 M	2	Weiß
F 3	2	Weiß
St 1	2	Weiß
St 1 M	2	Weiß
St 3 M	2	Weiß
St 5	2	Weiß
St 7	2	Weiß
Bifidobacterium dentium		
B 749	2	Scardovi
B 752	2	Scardovi
B 757	2	Scardovi
B 872	Vagina	Scardovi
B1000	Karies	Scardovi
B1010	Karies	Scardovi
B1020	Karies	Scardovi
B 735	Karies	Scardovi

Stammbezeichnung ⁺)		Fundort ⁺)	Herkunft/Neubezeichnung
B.catenulatum	B 669	2	Scardovi
	B 676	2	Scardovi
	B 684	2	Scardovi
	F 7	Abwasser	Scardovi
	F 44	Abwasser	Scardovi
	F 144	Abwasser	Scardovi
	F 171	Abwasser	Scardovi
B.angulatum	B 677	2	Scardovi
	F 158	Abwasser	Scardovi
	F 196	Abwasser	Scardovi
	F 424	Abwasser	Scardovi
	F 426	Abwasser	Scardovi
	F 406	Abwasser	Scardovi
B.adolescentis	B 618	2	Scardovi
	F 5	Abwasser	Scardovi
	F 17	Abwasser	Scardovi
	F 41	Abwasser	Scardovi
	F 147	Abwasser	Scardovi
	F 161	Abwasser	Scardovi
	F 250	Abwasser	Scardovi
	F 283	Abwasser	Scardovi
	F 337	Abwasser	Scardovi
	F 359	Abwasser	Scardovi
Bifidobacterium "subtile"	RU 424	Pansen	Scardovi
	F 395	Abwasser	Scardovi
B."minimum"	F 392	Abwasser	Scardovi
B.longum var.animalis			
	R 101-8	5	Mitsuoka
	C 10-45	4	Mitsuoka
B.animalis	P 23	7	Scardovi
	P 16	7	Scardovi
	P 17	7	Scardovi
	P 32	7	Scardovi
	F 437		Scardovi

Stammbezeichnung ⁺)		Fundort ⁺)	Herkunft/Neubezeichnung
B.magnum	RA 3	8	Scardovi
	RA 8	8	Scardovi
	RA 10	8	Scardovi
	RA 76	8	Scardovi
	RA 203	8	Scardovi
	RA 206	8	Scardovi
B.suis SU 859		3	Scardovi
B.pseudolongum	PNC-2-9G	3	Mitsuoka
	28T	7	Mitsuoka
	SRT	7	Mitsuoka
	Mo 2-10	6	Mitsuoka
B.globosum	RU 224	Pansen	Scardovi
	RU 230	Pansen	Scardovi
B.thermophilum	P2-91	3	Mitsuoka
	14-44	3	Mitsuoka
	P16-6	3	Mitsuoka
	Nissin	3	Mitsuoka
C 3/12		Pansen	Sharpe
B.ruminale	RU 326	Pansen	Scardovi
	RU 279	Pansen	Scardovi
	RU 442	Pansen	Scardovi
	RU 445	Pansen	Scardovi
B.asteroides	C 51	9	Scardovi
B.indicum	C 410	9	Scardovi
B.coryneforme	C 215/24	9	Scardovi
C 455		9	Scardovi
C 484		9	Scardovi
C 511		9	Scardovi

Stammbezeichnung ⁺⁺)	Herkunft
Staphylococcus epidermidis	ATCC 14990
Staphylococcus epidermidis	CCM 50
Lactobacillus casei 5 c	Sharpe
Lactobacillus bifementans	Galesloot N 2
Lactobacillus fermentum 15/7	Abo-Elnaga
Lactobacillus plantarum 2410	Nizo 3610
Lactobacillus bulgaricus 3 a	Weihenstephan ⁺⁺⁺⁺)
Streptococcus faecalis	ATCC 8043
Peptococcus prevotii	ATCC 9321
Peptococcus variabilis	ATCC 14955
Bifidobacterium breve S 46 ⁺⁺⁺)	Koch
B.longum BW ⁺⁺⁺)	Koch
B.longum BB ⁺⁺⁺)	Koch
Lactobacillus curvatus	ATCC 11146 (Lactobacillus bifidus)
Lactobacillus curvatus	ATCC 11147 (Lactobacillus bifidus)

⁺) Abkürzungen:

B. = Bifidobacterium, A. = Actinomyces,
 ATCC = American Type Culture Collection Rockville,
 Maryland, U.S.A. 20852

- | | |
|-------------------|------|
| 1 = Brustkinds- | Darm |
| 2 = Mischköstler- | " |
| 3 = Schweine- | " |
| 4 = Kalbs- | " |
| 5 = Ratten- | " |
| 6 = Mäuse- | " |
| 7 = Kücken- | " |
| 8 = Kaninchen- | " |
| 9 = Bienen- | " |

⁺⁺) Vergleichsstämme

⁺⁺⁺) Referenz-Zellwand-Präparationen zum Nachweis des Polysaccharid-Bestandteils 6-Desoxytalose

⁺⁺⁺⁺) Bakteriologisches Institut der Süddeutschen Versuchs- und Forschungsanstalt für Milchwirtschaft, Weihenstephan

2. Nährmedien, Kultivierung und Stammhaltung

2.1. Medium I (Clostridien-Anreicherungsmedium CAM):

Hefe-Extrakt (Merck)	5 g
Fleischextrakt (Merck)	5 g
Pepton aus Casein, tryptisch verdaut (Merck)	10 g
Glukose	5 g
NaCl	5 g
Na-Azetat $\times 3 \text{ H}_2\text{O}$	3 g
Tween 80 (Schuchardt)	1 ml
heißes Leitungswasser	1 l
pH: 6,8 (nach Autoklavieren: pH 7,1 - 7,2)	
<u>Sterilisation:</u> 20 min bei 120°C autoklavieren.	

2.2. Medium II (nach De Man, Rogosa und Sharpe, 1960):

Hefe-Extrakt (Merck)	4 g
Fleischextrakt (Merck)	2 g
Pepton aus Casein trypt.verdaut (Merck)	10 g
Glukose	20 g
L_2HPO_4 reinst, wasserfrei	2 g
Na-Azetat $\times 3 \text{ H}_2\text{O}$	5 g
Tween 80 (Schuchardt)	1 ml
Di-Ammonium-Hydrogen-Citrat	2 g
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	200 mg
$\text{MnSO}_4 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$	50 mg
destilliertes Wasser	1 l
pH: 6,5	
<u>Sterilisation:</u> siehe Medium I	

2.3. Medium III (CAM, modifiziert):

Hefe-Extrakt (Merck)	5 g
Fleischextrakt (Merck)	5 g
Pepton aus Casein, tryptisch verdaut (Merck)	10 g
Glukose	5 g
K ₂ HPO ₄ reinst, wasserfrei (Merck)	3 g
Tween 80 (Schuchardt)	1 ml
heißes Leitungswasser	ad 1 l
pH: 6,7 - 6,8	
<u>Sterilisation:</u> siehe Medium I	

2.4. Basalmedium zur Bestimmung des Spektrums vergärbarer Zucker (modifiziertes Medium II):

wie Medium II, aber ohne Glukose und Fleischextrakt,
+ 0,004 % Bromkresolpurpur (pH 6,8).

Sterilisation: siehe Medium I.

Zusatz der Testzucker erfolgte nach Sterilfiltration zusammen
mit Cystein und Ascorbat (siehe unten).

Zucker-Konzentration im Testmedium: 1 %.

2.5. Kulturbedingungen

Die Medien wurden vor dem Animpfen aufgekocht, um die gelöste
Luft auszutreiben, und wurden dann rasch auf ca. 60°C abge-
kühlt. Nun wurden 10 % (v/v) einer Lösung Asc/Cys (= 10 g
Natrium-L-Ascorbat + 0,5 g Cystein, ad 100 ml Wasser) unter
Sterilfiltration zugesetzt. Nach vorsichtigem Mischen und Ab-
kühlen auf ca. 40°C wurden 5 % (v/v) einer dicht bewachsenen
(Δ E (578 nm) = ca. 1,5) Bouillon steril hinzu pipettiert.
Inkubationstemperatur: 37 °C.

Zur Reinigung der Kulturen wurde das Kochsche Plattenverfahren
verwendet und Verdünnungsreihen angelegt (Verdünnungsmedium:
Leitungswasser mit 1 % Ascorbat). Als Verfestigungsmittel ent-

hielten die verwendeten Medien 1,5 % Agar-Agar (Serva). Da die Züchtung von Kolonien auf Platten optimale anaerobe Bedingungen erfordert, ist eine längere Lagerung von bereits gegossenen Platten (auch unter N_2) nicht möglich. Daher wurde folgendermaßen verfahren:

100 ml festes Medium wurde im Dampftopf verflüssigt, in einem Wasserbad auf ca. 60°C gehalten und (wie oben angegeben) 10 % Lösung Asc/Cys unter Sterilfiltration hinzugesetzt. Nach weiterem Erkalten auf etwa 45°C wurden (ca. 10) Platten gegossen. Nach Ausspateln der angelegten Verdünnungszellsuspensionen wurde im Anaerobentopf in einer N_2/CO_2 -Atmosphäre (besser: Leuchtgas) bei 37°C inkubiert. Zur chemischen Reduktion des Restsauerstoffs legten wir auch eine Platte mit 10 ml einer 10 %igen Pyrogallol-Lösung und 10 ml einer 50 %igen K_2CO_3 -Lösung (aufgesaugt in Zellstoff) bei.

2.6. Stammhaltung

Die Stämme wurden unter anaeroben Bedingungen als Agarstichkulturen bei 4°C aufbewahrt. Nach etwa 4 bis 6 Monaten wurden die Stämme in Bouillon übergeimpft und nach Überprüfung des normalen Wachstums sowie nach mikroskopischer Kontrolle auf Reinheit erneut in Stichagar geimpft. Dicht bewachsenen 10 ml-Bouillon-Röhrchen wurden parallel dazu bei -20°C eingefroren, nach 6, 12, 18, 24 Monaten aufgetaut, 1 ml in 10 ml frische Bouillon geimpft und wie üblich das Wachstum überprüft. Es zeigte sich, daß alle Stämme nach einem Jahr noch lebensfähig waren, die meisten sogar noch nach 2 Jahren. Aus diesem Grund erfolgte die weitere Stammhaltung sowohl im Stichagar- als auch im Bouillon-Einfrier-Verfahren.

3. Messung des Wachstums

Das Wachstum der Stämme wurde unter Zunahme der optischen Dichte bei 578 nm (Eppendorf-Photometer) bestimmt. Als Kontrolle diente das überstehende Medium nach Abzentrifugieren der Kulturen.

4. Zellen-Ernte

Die Zellen wurden 20 min durch Zentrifugieren bei 10 000 g₀ in Kühlzentrifugen geerntet, einmal in eiskaltem Leitungswasser mit 0,04 % (v/v) Mercaptoäthanol (Merck), danach zweimal in eiskaltem 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,5 (mit Mercaptoäthanol) gewaschen und bis zur Weiterverwendung bei -20°C eingefroren.

Im Falle von Massenkulturen (über 5 l Medium) erfolgte die Ernte mit Hilfe einer Durchlaufzentrifuge (Westfalia-Separator) unter Eiskühlung.

5. Aufschluß der Zellen, Gewinnung von Zellwänden und zellfreien Extrakten

Das (aufgetaute) Sediment wurde mit Glasperlen (0,17 - 0,18 mm Ø) vermengt, das Ganze in einer Zelmühle (Fa. Bühler) 10 min lang geschüttelt, und die Zellen dabei praktisch quantitativ aufgebrochen (mikroskopische Kontrolle im Phasenkontrastverfahren). Danach wurden die Glasperlen mit einer G-1-Fritte (Schott) unter Verwendung von eisgekühltem 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,5 (mit Mercaptoäthanol) wieder abgetrennt. Das trübe Filtrat enthielt Zellwände und Cytoplasma. Durch fraktionierte Zentrifugation bei 10 000 g₀ und 48 000 g₀ bei 4°C sind intakte Zellen, Zellwände und zellfreier Extrakt (Rohextrakt) voneinander zu trennen. Das Volumen des Extrakts wurde gemessen und dieser für enzymatische Tests sowie Enzymanreicherungen verwendet.

6. Reinigung und Hydrolysebedingungen der Zellwände

6.1. Reinigung.

Die sedimentierten Rohzellwände wurden mit Hilfe des Ultra-Turrax-Homogenisators in 100 ml 0,05 M Phosphatpuffer pH 7,8 aufgewirbelt und einer 24-stündigen, tryptischen Verdauung (0,5 mg Trypsin pro ml Suspension) in Gegenwart von Toluol bei 37°C unterworfen. Anschließend wurden die Zellwände erneut abzentrifugiert und nach viermaligem Waschen mit Wasser gefriergetrocknet.

6.2. Hydrolysebedingungen.

Es wurde unter gleichen Bedingungen hydrolysiert wie bei Schleifer und Kandler (1967) ausführlich beschrieben. Zur Untersuchung der Zuckerbestandteile des Zellwandpoly-saccharids wurden 5 mg Zellwand (tryptisch gereinigt) in zugeschnittenen Fiolaxröhrchen mit 2 N HCl bei 100°C im Wasserbad zwei Stunden hydrolysiert.

Zur Untersuchung des Gehalts der Zellwände an Aminosäuren und Aminozucker wurden die Zellwände (5 bis 10 mg) entweder 16 Stunden mit 0,5 ml 4 N HCl bei 100°C in zugeschmolzenen Fiolaxröhrchen hydrolysiert oder 30 (oder 60) min lang in kochendem Wasser einer Partialhydrolyse unterworfen.

Nach Beendigung der Hydrolysen wurden die Röhrchen aufgebrochen und die Salzsäure im Luftstrom abgeblasen. Die hydrolysierten Substanzen wurden zur Untersuchung (gemäß 7) herangezogen.

7. Qualitative und quantitative Untersuchungen der Zellwandzusammensetzung

7.1. Qualitative, papierchromatographische Auftrennung der hydrolysierten Zellwände.

Aminosäuren, -zucker und Peptide wurden im ein- oder zweidimensionalen, absteigenden Verfahren auf SS-2043b-Selecta-

Filtrierpapier aufgetrennt (Schleifer und Kandler, 1967). Zucker (und Aminosucker) wurden eindimensional auf Whatman-Nr.1-Chromatographiepapier aufgetrennt.

Folgende Lösungsmittelsysteme wurden verwendet (v/v):

a) Auftrennung der Aminosäuren, -zucker und Peptide:

System I: Isopropanol:Eisessig:H₂O = 75 : 10 : 15

System II: α -Picolin:H₂O:NH₃ = 70 : 28 : 2

b) Auftrennung von Zuckern und Aminosuckern:

System III: Butanol:Pyridin:H₂O:Eisessig = 60 : 40 : 30 : 3

System IV: Butanol:Propionsäure:H₂O = 750 : 352 : 798

Entwicklung der Papierchromatogramme:

Aminoverbindungen wurden mit Hilfe des Ninhydrin-Sprühareagenz, Neutral- und Aminosucker mit der Silbernitratmethode nach Trevelyan et al. (1950) sichtbar gemacht.

7.2. Qualitative und quantitative Analyse der Aminosäuren und -Zucker mit dem Beckman-Analysator.

Die bei der Totalhydrolyse von 0,25 mg Zellwandsubstanz freigesetzten Aminoverbindungen wurden nach der Methode von Spackman et al. (1958) mit Hilfe eines Analysators quantitativ bestimmt.

7.3. Fingerprint-Analyse der Aminosäuresequenz des Mureins.

Die zweidimensionale, papierchromatographische Auftrennung der partialhydrolysierten Zellwände ergibt nach der Entwicklung der Chromatogramme mit dem Ninhydrin-Sprühareagenz (siehe 7.1) je nach Aminosäure- und Peptidzusammensetzung charakteristisch angeordnete Fleckmuster ("Fingerprints"). Die unbekannten Aminoverbindungen dieser Fleckmuster können durch präparative Papierchromatographie nach Schleifer und Kandler (1967) isoliert und analysiert werden. In unserem Fall war es nur selten notwendig, sich dieses Verfahrens bedienen zu müssen, denn die bei unseren Untersuchungen erhaltenen Fingerprints und die

zu Grunde liegenden R_f -Werte der chromatographisch aufgetrennten Verbindungen waren aufgrund der in unserem Labor durchgeführten Analysen bekannt (Kandler et al., 1968; Koch, 1969; Holzapfel et al., 1969; Schleifer und Kandler, 1972). Das Verhältnis und die Art der am Aufbau des Mureins beteiligten Aminoverbindungen war ja (gemäß 7.2) nach der Analysator-Analyse ebenso bekannt.

8. Enzymatische Untersuchungen an zellfreien Extrakten

Der nach Punkt 5) erhaltene Rohextrakt wurde über Nacht gegen 0,01 M Phosphatpuffer pH 7,5 dialysiert und anschließend zum Test auf einige Enzyme herangezogen. Zur Kontrolle wurden auch nicht dialysierte Extrakte getestet.

8.1. Reagentien, Lösungen und Puffer.

Die bei den Enzymtests verwendeten Substanzen waren ausschließlich biochemisch oder analytisch reine, kommerziell erhältliche Präparate. Die Lösungen und Puffer wurden nach den bei Bergmeyer (1970) und Rauen (1964) angegebenen Vorschriften hergestellt. pH-Werte wurden mit dem pH-Meter (Pusl) bei 25°C überprüft.

8.2. Enzymtests.

Die enzymatischen Umsätze wurden photometrisch gemessen und aus der Extinktionsänderung pro Zeiteinheit die Aktivität ermittelt. Eine Enzymmenge, die 1 μ M Substrat pro min umsetzt entspricht einer Enzymeinheit (1 Unit U).

Die Extinktionen der Meßlösungen wurden in Voll- bzw. Halbmikro-Küvetten (1 cm Schichtdicke) aus optischem Spezialglas im 1101-M-Eppendorf- oder Zeiss-PMQII-Photometer gemessen. Zur Zeitmessung im Standardtest wurde eine Stoppuhr verwendet. Bei kinetischen Untersuchungen wurden die Umsätze (kontinuierlicher Test) anhand von Eppendorf-Kompensationsschreiber-Aufzeichnungen verfolgt.

8.2.1. FDP-aktivierte, NAD-abhängige L-LDH:

a) Umsatz von L-Laktat zu Pyruvat (Standardtest):

Ansatz pro Vollküvette (Testvolumen: 3,32 ml; Test bei Raumtemperatur)

Einsatz (ml)	Stammlösung		Endkonzentration in der Küvette (M)
	Bezeichnung	Konzentration (M)	
2,6	Imidazolpuffer pH 7,5	0,05	0,04
0,4	Li-L-Laktat	1	0,12
0,2	NAD ⁺	0,06	0,0036
0,1	FDP	0,033	0,0010

Mischen, dann 0,02 ml Rohextrakt (0,2 mg Protein) zugeben, erneut mischen und sofort $\Delta E/\text{min}$ bei 366 nm messen. Zur Kontrolle auf FDP-Abhängigkeit der Aktivität wurde der Umsatz zuerst ohne und anschließend mit FDP gemessen. Die Berechnung der Aktivität erfolgt nach der folgenden Gleichung :

$$\frac{U}{\text{ml}} = \Delta E/\text{min} \times \frac{V}{\epsilon_{366} \times d \times v} ;$$

(V = Gesamtvolumen in der Küvette (3,32 ml), $\epsilon_{366} = 3,3 \left(\frac{1}{\text{mM} \times \text{cm}} \right)$, d = 1 cm (Lichtweg), v = eingesetztes Volumen der unverdünnten Enzymlösung (ml).

b) Umsatz von Pyruvat zu L-Laktat, physiologische Reaktionsrichtung (Standardtest) :

Ansatz pro Vollküvette (Testvol.: 3,32; Test bei Raumtemperatur)

Einsatz (ml)	Stammlösung		Endkonzentration in der Küvette (M)
	Bezeichnung	Konzentration (M)	
3,0	Imidazolpuffer pH 7,5	0,05	0,045
0,1	Pyruvat	0,166	0,0050
0,1	NADH + H ⁺	0,013	0,0004

Mischen, dann 0,02 ml Rohextrakt (mit 1 bis maximal 4 mg Protein pro ml Extrakt) zugeben, erneut mischen und $\Delta E/\text{min}$ bei 366 nm messen. Anschließend 0,1 ml FDP-Stammlösung (Konzentration: 0,033 M; Endkonzentration in der Küvette: 0,001 M) zusetzen, mischen und sogleich $\Delta E/\text{min}$ bei 366 nm messen.

Zur Kontrolle auf NADH-Oxidase-Aktivität wurde der Umsatz zuerst ohne zugegebenes FDP und Pyruvat getestet. Anschließend wurde Pyruvat und dann FDP zugesetzt und jeweils eine Minute lang der Umsatz gemessen.

Die Aktivität der LDH errechnet sich analog nach der Gleichung unter a).

8.2.2. FDP-Aldolase.

Zur Bestimmung der Aldolase-Aktivität in zellfreien Extrakten benutzten wir zwei kommerziell erhältliche Testkombinationen der Fa. Boehringer Mannheim.

a) Farbstest (diskontinuierliche Methode):

Der Test beruht auf dem chemischen Nachweis von Triosephosphat, das durch Aldolase aus FDP gebildet, als Hydrazon abgefangen und unter Farbstoffbildung mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin umgesetzt und bei 546 nm gemessen wird. Den Proben wurde jeweils nach 10, 20, 30 min Inkubationsdauer bei 37°C Testgemisch entnommen, die Farbreaktion durchgeführt und die Extinktionsdifferenz gegenüber einer Kontrolle gemessen, bei der die Enzymzugabe erst unmittelbar vor Durchführung der Farbreaktion erfolgt war. Die Enzymaktivität wurde nach der von der Firma angegebenen Wertetabelle berechnet.

b) UV-Test (kontinuierliche Methode):

Bei diesem Test wird das durch Aldolase-Aktivität gebildete Triosephosphat enzymatisch (Glycerin-P-Dehydrogenase (GDH), Triose-P-Isomerase (TIM) durch NADH reduziert und die Extinktions-

abnahme pro Zeit bei 366 nm gemessen (Raumtemperatur). NADH-Oxidase-Aktivität stört. Aus diesem Grund wurde der Test modifiziert, so daß die Zugabe von FDP, NADH und Puffer getrennt erfolgen und der Umsatz mit bzw. ohne FDP gemessen werden konnte. Statt Collidinpuffer setzten wir Trispuffer (mit 0,3 mM Monojodazetat) ein. Anstelle von FDP konnte beim modifizierten Test auch F-6-P bzw. F-1-P als Substrat getestet werden.

Die Aktivität der Aldolase errechnet sich nach der Gleichung:

$$\frac{\text{mU}}{\text{ml}} = \Delta E / \text{min} \times \frac{V \times 1000}{\epsilon_{366} \times d \times v \times 2} ; \quad (\text{vgl. 8.2.1.a}).$$

Zum Vergleich testeten wir auch die Aktivität in den zellfreien Extrakten von Aldolase-besitzenden Lactobazillen wie *L. bulgaricus* und *L. casei*, während *L. fermentum* als Aldolase-negativer Vergleichsstamm diente.

8.2.3. Glukose-6-P- und 6-P-Glukonat-Dehydrogenase (King, 1970).

Ansatz pro Küvette (Testvolumen: 3,0 ml; Test bei Raumtemperatur)

Einsatz (ml)	Stammlösung	
	Bezeichnung	Konzentration
0,2	Mg ⁺⁺	0,3 M
0,2	Cystein	0,1 M
0,2	NAD ⁺ oder NADP ⁺	2 mg/ml
2,0	Glycylglycinpuffer pH 7,6	0,1 M
0,2	Substrat	0,03 M

Mischen und Umsatz mit 0,2 ml Rohextrakt starten. 10 min lang ΔE bei 366 nm messen. Als Substrat wurden Stammlösungen von Glukose-6-Phosphat oder Glukonat-6-Phosphat in Glycylglycinpuffer eingesetzt. Die Umsätze wurden mit denen der aktiven Extrakte von *L. fermentum* verglichen (negativer Teststamm: *L. bulgaricus*). Berechnung der Aktivität erfolgte analog nach der Gleichung unter 8.2.1.a.

8.2.4. Fruktose-6-P-Phosphoketolase.

a) Diskontinuierliche Methode (Schramm et al. 1958, modifiziert).

Der Test beruht auf dem chemischen Nachweis von Acetohydroxamat, das beim Umsatz von Hydroxylamin mit enzymatisch gebildetem Azetylphosphat entsteht und mit FeCl_3 unter Braunfärbung reagiert (Lipmann und Tuttle, 1945). Es wird bei 546 nm die Extinktion der Probe gegen eine Kontrolle gemessen, bei der zunächst kein Substrat (F-6-P) zugegeben worden war.

Der Testansatz erfolgte in mehreren Parallelröhrchen (Fiolax).

Stammlösung		Einsatz (ml)	
Bezeichnung	Konzentration (M)	Probe	Kontrolle
Trispuffer pH 7,5	0,1	0,2	0,2
Fruktose-6-P	0,3	0,05	0
H_2O	-	0	0,05
Thiamin-PP	0,065	0,05	0,05
Mg^{++}	0,3	0,05	0,05
Rohextrakt (10 mg/ml)	-	0,1	0,1
Phosphatpuffer pH 7,5	0,1	0,05	0,05

Mischen und bei 37°C inkubieren; nach 2, 4, 6, 10 und 15 min jeweils in ein Proberöhrchen (nach 15 min auch in das Kontrollröhrchen) 0,5 ml einer frisch bereiteten, eiskalten 2 M Hydroxylaminlösung (2 ml 4 M Hydroxylamin + 2 ml 1 N NaOH: pH 5,4) pipettieren, gut mischen und bei Raumtemperatur stehen lassen. In das Kontrollröhrchen sind außerdem nachträglich 0,05 ml F-6-P-Stammlösung hinzu zu geben. Nach 10 min 1 ml 10%ige Trichloressigsäure hinzu setzen, mischen und 4 ml 0,06 M Fe^{+++} (4,15 g $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ in 25 ml konzentrierter Salzsäure lösen, ad 250 ml H_2O) hinzugeben, gut mischen und davon 1 ml jeweils in der Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugieren. Extinktion in Halbmikro-Küvetten bei 546 nm gegen die Kontrolle messen.

Nach Einsatz verschiedener, bekannter Mengen an Azetyl-P zum Testgemisch wurde eine Eichkurve aufgestellt und anhand dieser der Umsatz bzw. die Aktivität des Enzyms berechnet.

b) Kontinuierlicher Test:

Bei diesem Test wird Thiamin-PP-gebundener, "aktiver" Glycolaldehyd (der bei Ketolase-katalysierten Reaktionen auftritt) mit Hexacaynoferrat-(III) oxidiert (Goldberg und Racker, 1962) und hierbei die Extinktionsabnahme bei 405 nm gemessen. Als Extinktionskoeffizient bei 405 nm (ϵ_{405}) ergab sich der Wert 1,0 ($1/\text{mM} \times \text{cm}$).

Ansatz pro Halbmikroküvette (Testvolumen: 1,27 ml; 1 cm Lichtweg)

Einsatz (ml)	Stammlösung		Endkonzentration in der Küvette (M)
	Bezeichnung	Konzentration (M)	
1,00	Trispuffer pH 7,5	0,10	0,08
0,02	$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$	0,03	0,00048
0,05	Fruktose-6-P	0,30	0,0118
0,05	Thiamin-PP	0,065	0,0028
0,05	Mg^{++}	0,3	0,0118

mischen, 0,1 ml Rohextrakt einsetzen, erneut mischen und $\Delta E_1/\text{min}$ bei 405 nm messen. Zur Kontrolle wird auch $\Delta E_2/\text{min}$ in Abwesenheit von F-6-P bestimmt. Aus der Differenz $\Delta E_1/\text{min}$ minus $\Delta E_2/\text{min}$ ergibt sich $\Delta E/\text{min}$. Die enzymatische Aktivität ergibt sich dann nach der Gleichung

$$\frac{\text{mU}}{\text{ml}} = \Delta E/\text{min} \times \frac{V \times 1000}{\epsilon_{405} \times d \times v \times 2}$$

(V = Gesamtvolumen in der Küvette (1,27 ml), $\epsilon_{405} = 1 (\frac{1}{\text{mM} \times \text{cm}})$, d = 1 cm (Lichtweg), v = Volumen der eingesetzten Enzym-lösung (ml)).

8.3. Proteinbestimmung:

Der Proteingehalt (mg/ml) der Enzymlösungen wurde mit Hilfe des Folin-Ciocalteus-Reagens nach der Methode von Lowry et al. (1951) bestimmt. Zur Aufstellung der Eichkurve wurde Rinderserum-albumin benutzt. Die Extinktionen der Probelösungen wurden bei 750 nm (Zeiss PMQII-Photometer, Einstellung: 6/1/I/A) gemessen.

8.4. Molekulargewicht der LDH:

Zur Bestimmung des Molekulargewichts einiger LDH wurde die Sephadex-Gel-Filtration (G 200) nach Andrews (1965) benutzt. Säule: 50 cm Länge, 3 cm Innendurchmesser. Dextran-Gel (gequollen): 250 ml. Elutionspuffer: 0,01 M Phosphatpuffer pH 7,3 mit 0,1 M KCl und 0,0003 M 1,4-Dithioerythrit. Elutionsgeschwindigkeit: 5 ml/Std. Fraktionsvolumen: 3,8 ml.

Eichlauf: Es wurden Eichproteine mit unterschiedlichen, bekannten Molekulargewichten und Dextranblau 2000 zur Frontmarkierung auf die Säule aufgetragen, und die Lage der Elutionsmaxima der Eichsubstanzen bestimmt. Der Logarithmus des Molekulargewichts der Eichproteine wurde gegen die Fraktionsnummer aufgetragen (Eichkurve). Anschließend erfolgte der Probelauf, bei dem etwa 10 mg Protein (pro ml Lösung) zusammen mit 50 µl einer gesättigten Dextranblau-2000-Lösung und 5 mg Cytochrom c auf die Säule aufgetragen wurden. Die Fraktion mit der höchsten LDH-Aktivität entspricht dem Elutionsmaximum der LDH, so daß mit Hilfe der Fraktionsnummer das Molekulargewicht der LDH aus der Eichkurve abgelesen werden kann.

9. Anreicherung der LDH

Zu kinetischen Untersuchungen reicherten wir die LDH von drei artverschiedenen Stämmen, *B. animalis* R 101-8, *B. pseudolongum* PNC-2-9G und *B. adolescentis* ATCC 15703, an. Die Anreicherungs-

Schritte wurden normalerweise bei 4°C durchgeführt. Die Aktivität in den Enzymfraktionen wurde mit dem Standardtest (Pyruvat $\longrightarrow$ Laktat) bestimmt.

9.1. Anreicherungs-schritte.

Zur Anreicherung der LDH wurde der nach Punkt 5) erhaltene Rohextrakt herangezogen.

Schritt 1: Ammonsulfatfraktionierung.

Feingepulvertes Ammonsulfat wurde langsam unter ständigem Rühren zum Rohextrakt zugesetzt. Die für die Fraktionierungsschritte 0-40%, 40-60% und 60-100 % Sättigung erforderlichen Ammonsulfatmengen wurden nach den Angaben von Colowick und Kaplan (1955) errechnet. Die Proteinpräzipitate wurden bei 48 000 g₀ 30 min lang abzentrifugiert und anschließend in 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,5 wieder gelöst.

Schritt 2: Hitze-fraktionierung.

Die aktivste Ammonsulfatfraktion (40-60 %) wurde 5 min lang einer Temperatur von 60° (Lauda-Umwälzwasserbad) ausgesetzt. Die Enzymlösung wurde durch einen in das Wasser eingetauchten, genau kalibrierten P7-PVC-Schlauch gepumpt und nach genau 5 min in einem Eisbad abgekühlt und in einem 20-ml-Pyrex-Zentrifugenglas gesammelt. Nachdem noch mit ein paar ml Puffer nachgespült worden war, wurde wie vorher abzentrifugiert. In der Regel enthielt diese angereicherte Fraktion keine NADH-Oxidase-Aktivität mehr und wurde zu den kinetischen Untersuchungen herangezogen.

Die LDH des Stammes R 101-8 wurde weiter zu reinigen versucht und daher zwei weitere Anreicherungs-schritte durchgeführt.

Schritt 3: II. Ammonsulfatfraktionierung.

Die im Schritt 2 erhaltene Fraktion wurde mit Puffer auf die Proteinkonzentration 5 mg/ml verdünnt und erneut mit Ammonsulfat bis 50 % Sättigung fraktioniert. Nach der Zentrifugation wurde das Präzipitat wieder in Puffer gelöst und der Überstand verworfen.

Schritt 4: Säulenchromatographie.

8 g Ecteola-Cellulose (Serva) wurden im Dekantationsverfahren mit 10^{-2} M Phosphatpuffer pH 7,6 (mit Mercaptoäthanol) äquilibriert und anschließend in eine Säule gegossen. Die Abmessungen des Säulenbetts waren $8,5 \times 2,2$ cm (Bettvolumen: ca. 135 ml). 1 ml der 2-stündig gegen den Äquilibrierpuffer dialysierten Ammonsulfatfraktion (II) wurde auf die Säule gepumpt. Nach 40 ml Vorlauf (Elutionspuffer = Äquilibrierpuffer) wurde mit einem linearen KCl-Konzentrationsgradienten eluiert (0 bis 0,3 M KCl pro 500 ml) und 4-ml-Fractionen (LKB-Fraktionskollektor) geschnitten. Zwischen Fraktion 35 (140 ml) und 45 (180 ml) wurde die LDH eluiert. Die beiden Fraktionen (38, 39) mit der höchsten Aktivität wurden gesammelt und ebenfalls zu kinetischen Untersuchungen verwendet.

10. Disc-Elektrophorese (Maurer 1968, modifiziert nach Stetter, 1973).

Die Disc-Elektrophorese im Polyacrylamid-Gel wurde genau nach den Angaben bei Stetter (1973) durchgeführt.

Bromphenolblau diente ebenfalls als Frontmarkierung. Auf die Gele wurden die nach Punkt 5) erhaltenen, anschließend gegen 10^{-2} M Phosphatpuffer pH 7,5 dialysierten und danach zentrifugierten Rohextrakte (0,1 mg bzw. 0,4 mg) aufgetragen. Zum Vergleich der Wanderungsgeschwindigkeiten wurde das dialysierte LDH-Isozym I aus Kaninchenmuskel (Boehringer Mannheim) ebenfalls auf ein Gel aufgetragen.

Der Elektrophorese-Lauf (bei 4°C) wurde beendet, wenn die Farbstoffbande (Bromphenolblau) am Ende des Gels angelangt war. Die säulenartig geformten Gele wurden vorsichtig den Elektrophorese-Glasröhrchen entnommen und in entsprechenden Reaktionslösungen zum Sichtbarmachen der Position der LDH-Bande bei Raumtemperatur inkubiert. Die Farbreaktion der LDH beruht auf dem chemischen Nachweis von NADH mit Hilfe von Nitroblau-Tetrazolium und Phenazinmethosulfat (Serva).

10.1. Lösungen zum Sichtbarmachen der LDH-Positionen.

Die LDH-Proteinbande im Gel kann auf zwei verschiedene Methoden spezifisch sichtbar gemacht werden. Entweder wird Pyruvat zu Laktat unter NADH-Verbrauch umgesetzt, so daß das Gel an der Stelle, an der sich die LDH befindet, nicht angefärbt wird, während sonst überall Violett-färbung eintritt (Negativ-Darstellung: a); oder (Positiv-Darstellung: b) man läßt Laktat zu Pyruvat unter NADH-Bildung umsetzen, so daß nur an der Stelle, an der sich die LDH befindet, Violett-färbung eintritt, während der übrige Gelbereich farblos bleibt.

Wir entwickelten unsere Gele sowohl nach Methode a als auch nach b. Da die Aktivität der LDH in den beiden Reaktionsrichtungen sehr verschieden ist, wurde im Fall a nur 0,1 mg Protein elektrophoretisch aufgetrennt, im Fall b dagegen 0,4 mg Protein.

a) Reaktion: Pyruvat $\longrightarrow$ L-Laktat. (0,1 mg Rohextrakt-Protein)
Reaktionslösung: 2 ml 0,1 M Trispuffer pH 7,5, 10 mg Pyruvat, 5 mg NADH, 0,75 mg FDP; etwa 1 min inkubieren, dann Lösung abgießen und entwickeln mit der

Entwicklerlösung: 3 ml 0,1 M Trispuffer pH 8,6, 6 mg Nitroblautetrazolium, 1 mg Phenazinmethosulfat.

Nach ca. 5 bis 10 sec Lösung abgießen, Gele abspülen und in Wasser aufheben. LDH: farblose Bande in violetterem Gel.

b) Reaktion: L-Laktat $\longrightarrow$ Pyruvat. (0,4 mg Rohextrakt-Protein).
Reaktions- und Entwicklerlösung: 2 ml 0,1 M Trispuffer pH 7,5, 3 mg NAD^+ , 3 mg Li-L-Laktat, 2 mg Nitroblautetrazolium, 0,3 mg Phenazinmethosulfat, 0,75 mg FDP. 1 Stunde im Dunkeln stehen lassen, dann Gele mehrmals abspülen und in Wasser aufheben.
LDH: Violette Bande in farblosem Gel.

Zum Vergleich ergab sich mit D-Laktat anstelle von L-Laktat keine Reaktion.

10.2. Auswertung.

Bei jedem Gel wurden die Wanderungsstrecken der LDH-Bande und des Markers Bromphenolblau vom Auftragungsort an abgemessen. Die zum Marker relative Wanderungsstrecke R_I der Kaninchen-muskel-LDH wurde willkürlich gleich 5 (cm) gesetzt und auf diesen Bezugswert die bei den anderen Gelen gemessenen Distanzen umgerechnet:

$$\frac{\text{relative Wanderungsgeschwindigkeit der LDH}}{\text{relative Wanderungsgeschwindigkeit der Bezugs-LDH}} = \frac{R}{R_I}$$

Geringe Unterschiede der Wanderungsgeschwindigkeiten zweier verschiedener LDH wurden durch Coelektrophorese abgesichert, d.h. es wurden zwei LDH auf ein Gel aufgetragen und nach der Auftrennung geprüft, ob sich eine identische oder zwei verschiedene Banden ergeben hatten.

11. Untersuchungen zur Gärungsphysiologie.

11.1. Glukose-Vergärung durch ruhende Kulturen im Puffer.

11.1.1. Inkubationspuffer:

0,1 M Phosphatpuffer pH 6,5 (bzw. pH 5,4) mit 1 % Ascorbat, 0,05 % Cystein und Indikator Bromkresolpurpur (bzw. Bromkresolgrün). In Vorversuchen hatten wir geklärt, daß weder Ascorbat noch Cystein verwertet wird, außerdem auch kein Einfluß auf das Verhältnis der aus 0,5 % Glukose gebildeten Produkte Azetat und L-Laktat vorhanden ist, sondern lediglich ein ausreichend niedriges Redoxpotential vorliegt. Auch 1 % Pyruvat oder FDP statt Glukose werden unter diesen Bedingungen nicht angegriffen.

11.1.2. Gewinnung von Zellen und Versuchsdurchführung:

10 ml einer gut gewachsenen Kultur in Medium III wurden in 220 ml frisches Medium geimpft. Das weitere Wachstum bei 37°C

wurde gemessen und die Zellen bei Erreichen der spät-logarithmischen oder bzw. frühstationären Phase geerntet, in Inkubationspuffer einmal gewaschen und in vorgewärmtem Puffer 30 min lang ohne Substrat bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen wieder abzentrifugiert und in 50 ml 37°C-warmem Puffer mit 2 % Glukose suspendiert und unter N₂-Spülung bei 37°C inkubiert; der pH-Wert wurde zunächst bis zu 2,5 Stunden lang mit 1 N NaOH konstant gehalten (pH-Meter), danach wurde die Titration eingestellt und weiter inkubiert. Zunächst wurde alle 30 min eine Probe (1 ml) entnommen (während der ersten 2 bis 3 Stunden) und eine weitere bei Versuchsende. Die Volumenzunahme durch Titration und die Flüssigkeitsverluste durch Abblasen wurden bei der Bestimmung der Gärungsprodukte berücksichtigt.

11.2. Vergärung durch wachsende Kulturen in Medium III.

11.2.1. Kultivierung:

10 ml einer spätlogarithmischen Vorkultur (Medium III) wurden zentrifugiert, die Zellen in Inkubationspuffer pH 6,5 gewaschen und anschließend in 2 ml Puffer aufgenommen. 0,2 ml dieser Zellsuspension wurden als Inoculum von 5 ml Medium III verwendet. Inkubation erfolgte in kurzen Reagenzgläsern (12 ml Fassungsvermögen) mit Gummistopfenverschluß in einem 37°C-Wasserbad. Zur Kontrolle des Glukoseverbrauchs wurden Parallelröhrchen mit inkubiert. Die Glukosekonzentration im Medium wurde enzymatisch bestimmt (siehe 11.3).

11.2.2. Radiochemikalien :

Verbindung:	spez. Aktivität:	Herkunft:
Glukose-1-C ¹⁴	0,25 mCi/0.885 mg	NEN-Chem.
Glukose-3-C ¹⁴	25 mikroCi/0.45 mg	NEN-Chem.
Glukose-3,4-C ¹⁴	10 mikroCi/0.13 mg	NEN-Chem.
Glukose-6-C ¹⁴	0.25 mCi/0.79 mg	NEN-Chem.
Glukose-u-C ¹⁴	0.25 mCi/0.19 mg	NEN-Chem.

11.2.3. Vergärung von uniform- und positionsmarkierter Glukose.

Die Vergärung der positionsmarkierten Glukose (wie unter b angegeben) erfolgte wie unter a beschrieben. Bei Vergärung von uniform-markierter Glukose bedienen wir uns des Warburg-apparates (Braun, Melsungen). Als Reaktionsgefäße dienten Kölbchen mit Seitenarm und Mitteleinsatz (ca. 70 ml Gesamtvolumen). Der Gasdruck der mit N_2 begasten Kölbchen wurde manometrisch verfolgt. Im Mitteleinsatz befanden sich 0,5 ml 5 %iger KOH zur Absorption von gebildetem CO_2 . Die eingesetzte Glukosemenge betrug 15 μM ($= 0,3 \%$), mit einer Radioaktivität von 3×10^6 Ipm.

11.3. Enzymatische Bestimmung von Glukose und Gärungsprodukten.

a) Bestimmung von Glukose (nach Bergmeyer et al., 1970).

Modifizierter Testansatz (für den Gebrauch von Halbmikroküvetten):

Einsatz (ml)	Stammlösung		Endkonzentration in der Küvette (M)
	Bezeichnung	Konzentration (M)	
1,1	Triäthanolaminpuffer pH 7,5 + Mg^{++}	0,3 0,003	0,3 0,003
0,1	Probe (max. Glukose- menge)	(0.003)	-
0,1	ATP + NADP ⁺	0,150/0,012	0,011/0,0009
Mischen und Extinktion bei 366 nm gegen Luft messen (E_0), dann			
0,02	Hexokinase + G-6-P-DH	(1 mg/ml)	-
dazu pipettieren, mischen und erneut nach 5 bis 10 min die Extinktion gegen Luft messen (E_1).			

Die Differenz der beiden gemessenen Extinktionen ($E_1 - E_0$) multipliziert mit dem Faktor 4 entspricht der Glukosekonzentration ($\mu M/ml$) in der Probe.

b) Bestimmung von Azetat (nach Holz und Bergmeyer, 1970):

Die Bestimmung beruht auf dem enzymatischen Test nach Rose (1955) und dem colorimetrischen Nachweis von Azetylphosphat nach Lipmann und Tuttle (1945).

c) Bestimmung von Laktat (nach Hohorst, 1970):

Zur enzymatischen Bestimmung von L-Laktat wurde Kaninchen-muskel-L-LDH (Kristallsuspension 5 mg/ml, Boehringer Mannheim), im Falle von D-Laktat wurde D-LDH aus *Leuconostoc mesenteroides* (Ammonsulfatfraktion 45 - 60 %) verwendet.

d) Bestimmung von Äthanol (nach Bernt et al., 1970):

Äthanol wurde mit Hilfe von Alkoholdehydrogenase (Boehringer Mannheim) bestimmt.

11.4. Isolierung der Gärungsprodukte.

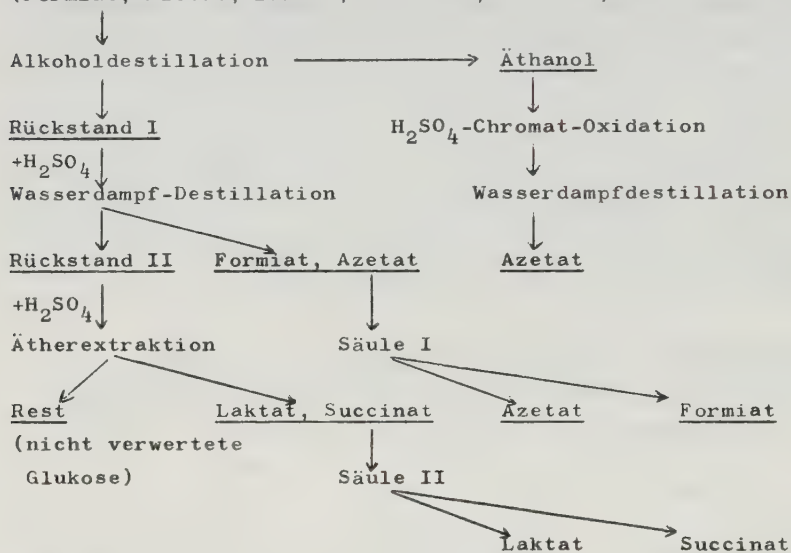
Zur Aufstellung der Gärungsbilanzen unter Verwendung von C^{14} -markierter Glukose waren die Produkte zu isolieren. Außerdem war die in den Zellen verbliebene Radioaktivität zu bestimmen und - bei Anwendung der Warburg-Methode (siehe 11.2.c) - die CO_2 -Bildung zu überprüfen.

11.4.1. Auftrennung der löslichen Fraktion:

Bevor die Bakterien aus der Fermentationsbrühe abgetrennt wurden, setzten wir die zu erwartenden Produkte in Form von unmarkierter Trägersubstanz hinzu: je 0,3 mM von L-Laktat, Azetat, Formiat und Succinat, außerdem 0,19 mM Äthanol. Dann wurden die Zellen abzentrifugiert, 2-mal in H_2O gewaschen, schließlich in 1 ml suspendiert und die Radioaktivität bestimmt (siehe unten). Das Waschwasser wurde zum Überstand hinzugefügt, dieser neutralisiert und quantitativ in einen Spitzkolben überführt. Die weitere Aufarbeitung erfolgte nach Neish (1952) gemäß folgendem Schema:

neutraler Überstand

(Formiat, Azetat, Laktat, Succinat, Äthanol, Rest)



Etwa $\frac{3}{4}$ des Volumens des neutralen Überstands wurde abdestilliert. Das Destillat wurde in einer verdünnten, chromatogesättigten Chromschwefelsäure aufgefangen und bei Zimmertemperatur 45 min stehen gelassen. Das zu Azetat oxidierte Äthanol wurde mit Hilfe einer fraktionierten Wasserdampfdestillation isoliert (Wiesenberg, 1948).

Der Rückstand I wurde mit 1 ml 10 N H₂SO₄ angesäuert und ebenfalls fraktioniert destilliert. Im Destillat wurden die abdestillierten Säuren mit eingestellter Natronlauge titriert. Die Destillation war beendet, wenn trotz längerer Destillation der Indikator Phenolphthalein deutlich bei Rot stehen blieb.

Der Rückstand II wurde mit H₂SO₄ auf pH 1 angesäuert und einer 36-stündigen kontinuierlichen Ätherextraktion unterworfen.

Die neutralisierten Säuren wurden am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt und in einem bekannten Volumen H_2O wieder gelöst. Ein Aliquot diente zur Messung der Radioaktivität.

11.4.2. Säulenchromatographische Trennung der Säuren (nach Varner, 1957).

8 g H_2O -gewaschenes und bei $180^\circ C$ getrocknetes Kieselgel (Mallinckrodt p.a. 100 mesh) wurden mit 4,65 ml 0,01 N HCl innig vermischt und 50 ml wassergesättigtem $CHCl_3$ suspendiert und auf das vorhandene Säulenbett aufgesetzt. Zur Entsalzung der aufzutragenden Proben bildeten 0,5 g $CHCl_3$ -gewaschenes Dowex H^+ nach oben den Abschluß des Betts. Die Salze der zu trennenden Säuren wurden in etwa 1 ml H_2O aufgenommen und unter leichtem Druck aufgetragen.

a) Säule I:

Zur Trennung von Formiat und Azetat wurden folgende Laufmittel verwendet (Stufengradient):

für Azetat: H_2O -ges. $CHCl_3$: Butanol = 97,5 : 2,5;

für Formiat: H_2O -ges. $CHCl_3$: Butanol = 92,5 : 7,5.

Pro Fraktion wurden 400 Tropfen gesammelt. Alle Fraktionen wurden mit 0,1 N NaOH titriert (Phenolphthalein). Auf diese Weise konnte die Lage der "peaks" ermittelt und eine Mengenbestimmung der Säuren erbracht werden. Nach quantitativer Elution der ersten Säure (Azetat) wurde das Laufmittel gewechselt und wie vorher weiter verfahren.

b) Säule II:

Trennung von Laktat und Succinat. Als Laufmittel diente hierzu:

Benzol : Butanol = 80 : 20. Pro Fraktion wurden 90 Tropfen gesammelt. Titration erfolgte wie oben beschrieben.

Die Fraktionen, die zu einem "peak" gehörten, wurden vereinigt und am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt. Die Salze der Säuren wurden abermals in einem bekannten Volumen H_2O gelöst und die Radioaktivität bestimmt.

11.5. Messung der Radioaktivität.

Zur Bestimmung der Radioaktivität im CO_2 (KOH), in den Bakterien und in den Säuren diente ein Methandurchfluß-Zählrohr der Fa. Friesseke und Höpfner (Erlangen).

Aliquote Mengen (10-20 Mikroliter) wurden möglichst gleichmäßig auf Alu-Folie-Plättchen (Durchmesser : 6 cm) unter leichtem Erwärmen (Heizplatte) ausgestrichen und im Zählrohr gemessen (Messung in unendlich dünner Schicht).

KOH-Karbonat-Lösungen wurden dagegen wegen ihres aggressiven Verhaltens auf Kupferplättchen (2 cm^2) ausgestrichen und sofort gemessen (wie oben).

III. E r g e b n i s s e

1. Untersuchung der Zellwandzusammensetzung der Bifidobakterien.

Die vergleichenden Untersuchungen der Zellwandzusammensetzung stellen eine Erweiterung der Arbeit von Koch (1969) dar, welcher Stämme aus dem Darm des Menschen untersucht und eine gute Parallelität zwischen der Zellwand-Zusammensetzung und den physiologischen Merkmalen dieser Stämme gefunden hatte.

Wir untersuchten zunächst die Zellwand-Zusammensetzung bei weiteren Stämmen aus dem Darm des Menschen und dehnten die Untersuchungen dann auf die aus anderen Biotopen isolierten Stämme aus.

1.1. Murein.

Tab.3 A zeigt die qualitative und quantitative Aminosäure- und Aminosucker-Zusammensetzung der Zellwände. Die in der Tabelle angeführten, verschiedenen Mureintypen ergaben sich aus den Molverhältnissen der Aminosäuren und -sucker und aus den Fingerprintanalysen der bei der Partialhydrolyse der Zellwände freigesetzten Peptide.

Tab.3A: Molare Verhältnisse der Aminosäuren und Amino Zucker in tryptisch gereinigten Zellwänden.

A) L-Lys-Gly-Typ:

Stamm		Ala	Glu	Lys	Gly	Mur	GlcNH ₂	NH ₃
<u>B.breve</u>								
S1 2,	µM/mg	0,44	0,30	0,22	0,27	0,19	0,33	0,23
	Glu=1	1,50	1,00	0,75	1,42	0,65	1,14	0,80
S1 1	µM/mg	0,59	0,33	0,30	0,44	0,20	0,30	0,30
	Glu=1	1,76	1,00	0,88	1,31	0,58	0,88	0,88
S1 4	µM/mg	0,11	0,06	0,08	0,05	0,03	0,17	0,11
	Glu=1	1,70	1,00	1,23	0,86	0,45	2,63	1,63
B.862	µM/mg	0,31	0,26	0,15	0,13	0,20	0,32	0,27
	Glu=1	1,23	1,00	0,59	0,50	0,77	1,24	1,07
<u>B.parvulorum</u>								
S1 3	µM/mg	0,39	0,25	0,20	0,23	0,18	0,24	0,21
	Glu=1	1,61	1,00	0,85	0,96	0,77	1,01	0,88
S1 6	µM/mg	0,25	0,15	0,16	0,13	0,08	0,12	0,19
	Glu=1	1,68	1,00	1,08	0,87	0,52	0,80	1,23
S1 7	µM/mg	0,40	0,21	0,18	0,29	0,12	0,20	0,22
	Glu=1	1,96	1,00	0,87	1,43	0,57	0,96	1,06
<u>B.asteroides</u>								
C 51	µM/mg	0,23	0,11	0,14	0,10	0,06	0,14	0,10
	Glu=1	2,04	1,00	1,24	0,88	0,53	1,28	0,93

B) L-Lys-L-Ser-Typ:

<u>Minimum-Gruppe</u>		Ala	Glu	Lys	Ser	Mur	GlcNH ₂	NH ₃
F 392	µM/mg	0,50	0,28	0,24	0,23	0,26	0,26	0,33
	Glu=1	1,81	1,00	0,86	0,85	0,94	0,93	1,20

C) L-Orn (L-Lys)-D-Ser-D-Asp-Typ:

Stamm		Ala	Glu	Orn	Lys	Asp	Ser	Mur	GlcNH ₂	NH ₃
<u>B.bifidum</u>										
E 319 f	µM/mg	0,47	0,22	0,18	0,03	0,21	0,17	0,15	0,24	0,17
	Glu=1	2,13	1,00	0,83	0,14	0,94	0,79	0,68	1,10	0,77
S1 1a	µM/mg	0,24	0,13	0,10	Spur	0,14	0,10	0,11	0,20	0,13
	Glu=1	1,82	1,00	0,76		1,05	0,77	0,84	1,57	1,02
H1 3	µM/mg	0,33	0,19	0,13	-	0,18	0,14	0,22	0,25	0,17
	Glu=1	1,75	1,00	0,69		0,95	0,78	1,16	1,32	0,89

Tab.3A - Fortsetzung

D) L-Orn(L-Lys)-L-Ser-L-Ala-L-Thr-L-Ala-Typ:

Stamm		Ala	Glu	Orn	Lys	Ser	Thr	Mur	GlcNH ₂	NH ₃
<u>A.parabifidus</u>										
ATCC										
1793o	µM/mg	0,72	0,19	0,18	Spur	0,17	0,17	0,20	0,19	0,32
	Glu=1	3,91	1,00	0,95		0,90	0,90	1,06	1,02	1,74
<u>B.longum var.longum</u>										
W 1	µM/mg	0,90	0,20	0,16	Spur	0,16	0,17	0,22	0,31	0,20
	Glu=1	4,41	1,00	0,76		0,79	0,85	1,08	1,51	1,00
W 3	µM/mg	0,93	0,25	0,22	0,02	0,22	0,23	0,23	0,22	0,23
	Glu=1	3,65	1,00	0,86	0,06	0,88	0,91	0,89	0,88	0,92
W 4	µM/mg	0,70	0,19	0,15	0,01	0,14	0,15	0,13	0,17	0,22
	Glu=1	3,67	1,00	0,77	0,07	0,73	0,80	0,68	0,89	1,15
W 5	µM/mg	0,84	0,23	0,20	Spur	0,21	0,21	0,21	0,23	0,21
	Glu=1	3,70	1,00	0,88		0,93	0,93	0,93	1,01	0,91
Bs 9 M	µM/mg	0,49	0,13	0,16	Spur	0,09	0,10	0,07	0,16	0,18
	Glu=1	3,93	1,00	1,25		0,71	0,75	0,53	1,27	1,47
F 2 M	µM/mg	0,63	0,19	0,14	Spur	0,14	0,14	0,14	0,22	0,21
	Glu=1	3,32	1,00	0,71		0,75	0,74	0,76	1,14	1,09
F 3	µM/mg	0,43	0,10	0,13	0,04	0,07	0,08	0,05	0,18	0,21
	Glu=1	4,11	1,00	1,27	0,35	0,73	0,80	0,53	1,75	2,02
<u>var.animalis</u>										
C 10-45	µM/mg	0,92	0,29	0,24	Spur	0,22	0,23	0,26	0,24	0,41
	Glu=1	3,14	1,00	0,81		0,75	0,78	0,90	0,81	1,40
<u>B.suis</u>										
SU 859	µM/mg	0,57	0,11	0,12	Spur	0,09	0,08	0,07	0,16	0,12
	Glu=1	4,99	1,00	1,03		0,78	0,70	0,62	1,39	1,07

E) L-Lys(L-Orn)-L-Ser-L-Ala-L-Ala-Typ:

Stamm		Ala	Glu	Lys	Orn	Ser	Mur	GlcNH ₂	NH ₃
<u>B.animalis</u>									
R 101-8	µM/mg	1,49	0,33	0,17	0,13	0,09	0,32	0,26	0,36
	Glu=1	4,51	1,00	0,51	0,41	0,27	0,98	0,78	1,08
P 23	µM/mg	1,41	0,33	0,26	0,04	0,14	0,31	0,27	0,33
	Glu=1	4,26	1,00	0,79	0,13	0,43	0,94	0,81	0,99
P 16	µM/mg	0,95	0,24	0,10	0,12	0,09	0,20	0,16	0,23
	Glu=1	4,04	1,00	0,44	0,50	0,36	0,84	0,67	0,96
P 17	µM/mg	1,18	0,27	0,14	0,12	0,08	0,26	0,22	0,27
	Glu=1	4,33	1,00	0,51	0,45	0,28	0,95	0,81	1,00
P 32	µM/mg	0,82	0,21	0,10	0,10	0,08	0,16	0,13	0,21
	Glu=1	3,98	1,00	0,48	0,47	0,40	0,76	0,64	1,01
F 437	µM/mg	1,34	0,30	0,10	0,18	0,08	0,25	0,22	0,30
	Glu=1	4,47	1,00	0,35	0,59	0,27	0,84	0,73	1,00
<u>B.adolescentis</u>									
B 618	µM/mg	1,12	0,29	0,26	0,03	0,11	0,27	0,29	0,31
	Glu=1	3,85	1,00	0,89	0,12	0,39	0,92	1,01	1,08

Tab.3A - Fortsetzung

F) L-Lys(L-Orn)-L-Ala-L-Ala-L-Ser-Typ:

Stamm		Ala	Glu	Lys	Orn	Ser	Mur	GlcNH ₂	NH ₃
<u>B.magnum</u>									
RA 3	µM/mg	1.34	0.35	0.30	Spur	0.31	0.37	0.30	0.36
	Glu=1	3.82	1.00	0.87		0.89	1.05	0.86	1.04
RA 8	µM/mg	1.26	0.34	0.30	Spur	0.28	0.33	0.26	0.33
	Glu=1	3.74	1.00	0.88		0.83	0.98	0.76	0.97
RA 10	µM/mg	1.55	0.41	0.37	0.03	0.31	0.40	0.33	0.42
	Glu=1	3.83	1.00	0.91	0.07	0.78	0.98	0.81	1.04
RA 76	µM/mg	1.56	0.40	0.36	Spur	0.28	0.38	0.31	0.39
	Glu=1	3.92	1.00	0.91		0.71	0.95	0.78	0.99
RA 203	µM/mg	1.54	0.42	0.38	Spur	0.34	0.39	0.35	0.40
	Glu=1	3.70	1.00	0.91		0.82	0.94	0.84	0.95
RA 206	µM/mg	1.71	0.42	0.38	Spur	0.40	0.44	0.36	0.43
	Glu=1	4.06	1.00	0.89		0.95	1.04	0.85	1.03
<u>B.catenulatum</u>									
B 676	µM/mg	1.00	0.26	0.22	0.03	0.17	0.23	0.23	0.25
	Glu=1	3.81	1.00	0.83	0.13	0.66	0.89	0.87	0.97
B 684	µM/mg	1.18	0.30	0.26	0.03	0.24	0.27	0.27	0.33
	Glu=1	3.94	1.00	0.86	0.11	0.80	0.91	0.89	1.09
F 44	µM/mg	0.93	0.25	0.18	0.06	-	0.22	0.29	0.28
	Glu=1	3.72	1.00	0.73	0.23		0.89	1.18	1.14
F 144	µM/mg	1.09	0.29	0.21	0.07	0.15	0.28	0.32	0.31
	Glu=1	3.84	1.00	0.75	0.23	0.51	0.97	1.13	1.07
F 171	µM/mg	1.20	0.30	0.28	-	0.13	0.27	0.29	0.34
	Glu=1	4.04	1.00	0.95		0.42	0.90	0.98	1.15

G) L-Lys(L-Orn)-L-Ala-L-Ala(L-Ala)-Typ:

Stamm		Ala	Glu	Lys	Orn	Mur	GlcNH ₂	NH ₃
<u>B.pseudolongum</u>								
PNC-2-9G	µM/mg	1,40	0,31	0,15	0,13	0,32	0,26	0,19
	Glu=1	4.54	1,00	0,49	0,44	1,03	0,85	0,62
28 T	µM/mg	1,31	0,27	0,03	0,27	0,26	0,26	0,31
	Glu=1	4.79	1,00	0,10	1,00	0,94	0,94	1,14
29 SRT	µM/mg	1,16	0,26	0,09	0,17	0,27	0,24	0,34
	Glu=1	4.38	1.00	0.34	0,65	1,03	0,92	1,29
Mo 2-10	µM/mg	1,16	0,29	0,09	0,18	0,22	0,34	0,37
	Glu=1	3.92	1.00	0,30	0,60	0,75	1,16	1.24
<u>B.globosum</u>								
RU 230	µM/mg	1.89	0.36	0.17	0,17	0.27	0.38	0.37
	Glu=1	5.33	1.00	0.48	0.48	0.77	1.08	1.04
RU 224	µM/mg	1.18	0.25	0.08	0.17	0.22	0.29	0.28
	Glu=1	4.72	1.00	0.32	0.68	0.89	1.18	1.14

Tab.3A - Fortsetzung

H) L-Lys(L-Orn)-D-Asp-Typ:

Stamm		Ala	Glu	Lys	Orn	Asp	Mur	GlcNH ₂	NH ₃
<u>B.adolescentis</u>									
F 1	µM/mg	0,39	0,21	0,06	0,03	0,08	0,15	0,20	0,39
	Glu=1	1.82	1.00	0,29	0,13	0,36	0,69	0,95	1.83
F 2	µM/mg	0,22	0,12	0,06	-	0,05	0,08	0,15	0,28
	Glu=1	1.86	1.00	0,51		0,40	0,67	1.25	2.36
Ms 1	µM/mg	0,51	0,30	0,13	0,02	0,15	0,27	0,30	0,40
	Glu=1	1.72	1.00	0,42	0,06	0,49	0,91	1.02	1.35
Sl 8	µM/mg	0,40	0,21	0,05	0,05	0,09	0,16	0,21	0,44
	Glu=1	1.88	1.00	0.25	0.24	0.43	0.76	0.99	2.10
St 1	µM/mg	0,53	0.26	0,11	0,03	0,10	0,15	0,33	0,54
	Glu=1	2.01	1.00	0.41	0,12	0,39	0,55	1.24	2.04
St 1 M	µM/mg	0,74	0,37	0,13	0,06	0,16	0,24	0,41	0,55
	Glu=1	2.01	1.00	0.35	0,15	0,44	0.65	1.11	1.49
St 3 M	µM/mg	0,36	0,22	0,06	0,03	0,07	0,18	0,22	0,34
	Glu=1	1.63	1.00	0.28	0,13	0,30	0,80	1.01	1.59
St 5	µM/mg	0,31	0,17	0,05	0,03	0,04	0,07	0,17	0,39
	Glu=1	1.85	1.00	0.30	0.17	0.26	0.44	1.03	2.33
St 7	µM/mg	0,73	0,40	0,13	0,04	0,17	0,37	0,49	0,58
	Glu=1	1.84	1.00	0.33	0.11	0.43	0.93	1.23	1.45
RU 424	µM/mg	0,30	0,13	0,06	-	0,05	0,06	0,20	0,22
	Glu=1	2.30	1.00	0.47		0.35	0.49	1.51	1.67
ATCC 15703	µM/mg	0,53	0,28	0,09	0,05	0,14	0,26	0,23	0,48
	Glu=1	1.88	1.00	0.33	0,16	0,50	0,93	0.82	1.69
F 5	µM/mg	0,45	0,25	0,11	0,04	0,15	0,24	0,22	0,36
	Glu=1	1.80	1.00	0.45	0,17	0,59	0,94	0.87	1.46
F 41	µM/mg	0,62	0,34	0,07	0,12	0,19	0,32	0,29	0,36
	Glu=1	1.85	1.00	0.22	0.36	0.57	0.96	0.86	1.08
F 161	µM/mg	0,59	0,33	0,06	0,15	0,20	0,28	0,26	0,52
	Glu=1	1.82	1.00	0.17	0.45	0.62	0.85	0.78	1.60
F 250	µM/mg	0,57	0,32	0,07	0,13	0,20	0,28	0,26	0,45
	Glu=1	1.80	1.00	0.20	0.41	0.64	0.89	0.83	1.43
F 283	µM/mg	0,42	0,23	0,06	0,09	0,14	0,19	0,16	0,34
	Glu=1	1.86	1.00	0.25	0.39	0.61	0.82	0.72	1.52
F 337	µM/mg	0,59	0,35	0,05	0,16	0,21	0,30	0,29	0,51
	Glu=1	1.70	1.00	0.14	0.47	0.61	0.87	0.80	1.47
F 359	µM/mg	0,48	0,28	0,06	0,12	0,15	0,24	0,22	0,41
	Glu=1	1.72	1.00	0.20	0.43	0.55	0.87	0.78	1.48
<u>A.eriksonii</u>									
ATCC 15423	µM/mg	0,49	0,31	0,11	0,05	0,22	0,20	0,29	0,29
	Glu=1	1.56	1.00	0.35	0.14	0.69	0.64	0.93	0.94

Tab.3A - Fortsetzung

Stamm		Ala	Glu	Lys	Orn	Asp	Mur	GlcNH ₂	NH ₃
<u>B.appendicitis</u>									
3808	µM/mg	0,58	0,35	0,18	-	0,20	0,29	0,34	0,50
	Glu=1	1,66	1,00	0,52		0,57	0,84	0,98	1,44
4343	µM/mg	0,45	0,25	0,11	-	0,15	0,20	0,20	0,40
	Glu=1	1,80	1,00	0,45		0,61	0,80	0,82	1,61
<u>B.dentium</u>									
B 749	µM/mg	0,56	0,32	0,10	0,13	0,19	0,25	0,25	0,48
	Glu=1	1,76	1,00	0,30	0,42	0,61	0,79	0,79	1,49
B 752	µM/mg	0,63	0,34	0,11	0,11	0,21	0,27	0,26	0,52
	Glu=1	1,85	1,00	0,33	0,33	0,61	0,80	0,75	1,51
B872	µM/mg	0,58	0,33	0,13	0,03	0,19	0,26	0,27	0,22
	Glu=1	1,77	1,00	0,38	0,10	0,58	0,79	0,82	0,65
B 1000	µM/mg	0,59	0,34	0,17	-	0,18	0,31	0,31	0,50
	Glu=1	1,73	1,00	0,49		0,52	0,90	0,89	1,44
B 735	µM/mg	0,51	0,31	0,11	0,09	0,15	0,24	0,23	0,45
	Glu=1	1,66	1,00	0,37	0,28	0,50	0,77	0,76	1,47
<u>B.angulatum</u>									
B 677	µM/mg	0,60	0,35	0,19	-	0,21	0,36	0,29	0,51
	Glu=1	1,70	1,00	0,55		0,59	1,03	0,83	1,45
F 158	µM/mg	0,49	0,30	0,15	-	0,15	0,36	0,25	0,42
	Glu=1	1,65	1,00	0,49		0,51	1,20	0,83	1,41
F 196	µM/mg	0,56	0,32	0,17	-	0,19	0,31	0,27	0,50
	Glu=1	1,74	1,00	0,51		0,59	0,96	0,84	1,55
F 424	µM/mg	0,60	0,35	0,17	0,03	0,19	0,37	0,31	0,55
	Glu=1	1,71	1,00	0,47	0,08	0,53	1,05	0,89	1,56
F 426	µM/mg	0,58	0,33	0,16	-	0,18	0,31	0,28	0,50
	Glu=1	1,75	1,00	0,50		0,54	0,94	0,84	1,51
F 406	µM/mg	0,58	0,34	0,19	-	0,20	0,33	0,28	0,52
	Glu=1	1,73	1,00	0,55		0,58	0,98	0,83	1,53
<u>B.catenulatum</u>									
B 669	µM/mg	0,55	0,30	0,17	-	0,18	0,29	0,23	0,43
	Glu=1	1,83	1,00	0,55		0,59	0,97	0,78	1,44
F 7	µM/mg	0,35	0,20	0,09	0,02	0,11	0,21	0,20	0,32
	Glu=1	1,72	1,00	0,44	0,12	0,56	1,02	0,98	1,60
<u>Subtile-Gruppe</u>									
F 395	µM/mg	0,55	0,29	0,17	-	0,17	0,30	0,27	0,45
	Glu=1	1,89	1,00	0,57		0,59	1,04	0,93	1,54
<u>B.coryneforme</u>									
C 215/24	µM/mg	0,24	0,10	0,05	-	0,03	0,08	0,20	0,24
	Glu=1	2,34	1,00	0,50		0,31	0,81	1,91	2,35
C 455	µM/mg	0,28	0,12	0,06	-	0,03	0,13	0,21	0,20
	Glu=1	2,31	1,00	0,50		0,25	1,07	1,74	1,67
<u>B.indicum</u>									
C 410	µM/mg	0,29	0,13	0,05	-	0,04	0,13	0,20	0,20
	Glu=1	2,25	1,00	0,42		0,33	0,97	1,54	1,56

Tab.3A - Fortsetzung

I) L-Lys(L-Orn)-D-Glu-Typ:

Stamm		Ala	Glu	Lys	Orn	Mur	GlcNH ₂	NH ₃
<u>B.thermophilum</u>								
P 2-91	µM/mg	0,33	0,42	0,02	0,21	0,17	0,30	0,23
	Glu=2	1.57	2.00	0.09	0.98	0.81	1.42	1.07
14 - 44	µM/mg	0.22	0.27	0.09	0.07	0.08	0.23	0.11
	Glu=2	1.66	2.00	0.68	0.56	0.56	1.72	0.84
P 16-6	µM/mg	0.45	0.58	0.03	0.26	0.28	0.28	0.33
	Glu=2	1.55	2.00	0.12	0.91	0.97	0.97	1.14
Nissin	µM/mg	0.25	0.28	Spur	0.23	0.05	0.12	0.23
	Glu=2	1.75	2.00		1.64	0.34	0.85	1.64
C 3/12	µM/mg	0.32	0.37	Spur	0.29	0.12	0.14	0.28
	Glu=2	1.76	2.00		1.60	0.63	0.74	1.59
<u>B.ruminale</u>								
RU 326	µM/mg	0.42	0.46	0.05	0.18	0.14	0.27	0.23
	Glu=2	1.82	2.00	0.22	0.78	0.62	1.22	1.00
Ru 279	µM/mg	0.63	0.67	0.26	0.04	0.21	0.35	0.33
	Glu=2	1.88	2.00	0.78	0.14	0.62	1.04	0.99
RU 442	µM/mg	0.32	0.45	0.04	0.15	0.16	0.30	0.18
	Glu=2	1.43	2.00	0.20	0.66	0.70	1.32	0.80
RU 445	µM/mg	0.43	0.56	0.09	0.17	0.18	0.32	0.22
	Glu=2	1.54	2.00	0.34	0.62	0.64	1.16	0.78

Da es sich in keinem Fall um unbekannte Peptidmuster (Fingerprints) handelte und alle Peptide von früheren Untersuchungen her bekannt waren (Kandler et al., 1968; Holzapfel et al., 1969; Koch, 1969; Koch et al. 1970 a, b; Schleifer und Kandler, 1972), konnten die Mureintypen ohne weitere Versuche angesprochen werden.

Der einzige, häufig auftretende Unterschied zwischen gleichartigen Mureinen von Bifidobakterien und denen anderer Gram-positiver Bakterien liegt darin, daß bei ersteren Lysin und Ornithin gemeinsam vorkommen können und dabei alternativ die Position der Diaminosäure in der Peptiduntereinheit einnehmen. Dies wird durch das gemeinsame Auftreten von analog zusammengesetzten, Ornithin bzw.

Lysin enthaltenden Peptiden in Partialhydrolysaten bewiesen. Aber auch das Molverhältnis der Aminosäuren spricht dafür, denn das Molverhältnis von Ornithin plus Lysin zu Glutaminsäure ist 1 : 1, bzw. 1 : 2. Letzteres ist bei solchen Mureinen der Fall, bei denen nicht nur die Peptiduntereinheit, sondern auch die Interpeptidbrücke ein Molekül Glutaminsäure enthält. Das Verhältnis von Ornithin zu Lysin kann dabei von Stamm zu Stamm einer Art verschieden sein, wird aber nicht wesentlich von der bei der Kultivierung der Organismen im Medium vorhandenen Menge Lysin oder Ornithin beeinflusst (Schleifer und Kandler, 1972).

Bei den aus dem Darm des Menschen isolierten Stämmen fanden wir die gleichen fünf Mureintypen wie Koch (1969). *B. breve* und *B. parvulorum* wiesen auch bei uns Murein vom Lys-Glv-Typ auf, *B. bifidum* den Orn(Lys)-Ser-Asp-Typ, *B. longum* den Orn(Lys)-Ser-Ala-Thr-Ala-Typ, *B. adolescentis* den (Orn)Lys-Asp-Typ und ein Stamm den Lys-Ser-Ala₂-Typ, der auch bei dem Stamm P 6 (Koch, 1969) vorhanden ist.

Bei den aus anderen Biotopen isolierten Arten ergaben sich außer den schon bekannten noch vier weitere Mureintypen. Es handelt sich um den Lys-Ser-, Lys(Orn)-Ala₂-Ser-, Lys(Orn)-Ala₂₋₃ und den Lys(Orn)-Glu-Typ. Insgesamt sind also bei Bifidobakterien 9 Mureintypen zu unterscheiden (Abb.2).

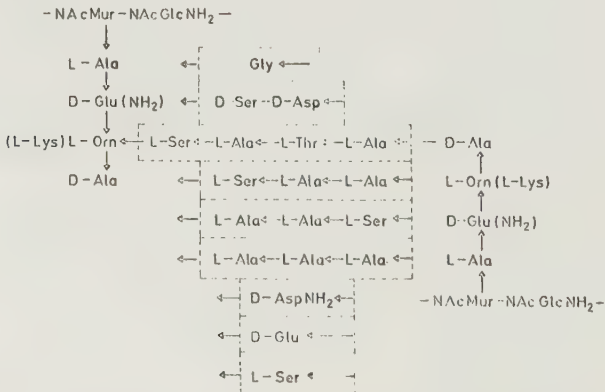


Abb.2: Ausschnitt aus der Primärstruktur der Mureine der Bifidobakterien.

Der Mureintyp ist bei allen untersuchten Stämmen einer Art (außer bei *B. catenulatum*, siehe unten) gleich, also handelt es sich um ein artspezifisches Merkmal. Dies entspricht den Erfahrungen, die bisher bei Gram-positiven Bakterien allgemein gemacht wurden (Schleifer und Kandler, 1972).

Bei den Stämmen von *B. catenulatum* ergaben sich allerdings zwei verschiedene Mureintypen, nämlich der Lys(Orn)-Asp- und der Lys(Orn)-Ala₂-Ser-Typ, wobei der Typstamm B 669 dem ersteren entspricht. Bei diesen Stämmen handelt es sich mit größter Wahrscheinlichkeit nicht um ein und dieselbe Art, denn die Ribosomen-unabhängige Synthese der beiden Interpeptidbrücken erfolgt in dem einen Fall über D-Aspartyl-β-Phosphat (Staudenbauer, 1968), in dem anderen dagegen über t-RNS-aktiviertes L-Serin bzw. L-Alanin (Petit et al., 1968; Roberts et al., 1968). Die beiden Synthese-Wege sind also so sehr verschieden, wie sie eigentlich nur bei verschiedenen Arten ausgeprägt sein können und nicht bei ein und derselben Art. Es überrascht daher, daß Scardovi et al. (1974) mehr als 80 % Homologie zwischen der DNS des Typstamms B 669 und der der anderen Stämme feststellen konnten (siehe Tab.3B). Hierbei ist allerdings zu bedenken, daß die Bestimmungen der DNS-Homologie und die Analyse des Zellwandaufbaus nicht an ein und dem gleichen Zellmaterial durchgeführt wurden. Im Rahmen unserer Methodik war uns dies bisher leider noch nicht möglich. Aber solche Fälle zeigen (siehe Schlußbetrachtung, Kapitel IV.), daß in Zukunft eine entsprechende Absicherung der Identität der Stämme von erheblicher Bedeutung ist.

1.2. Zellwandpolysaccharide und -Teichonsäuren.

Die qualitative Zuckerzusammensetzung der Zellwandhydrolysate (2 Std./100°C/2 N HCl) zeigt die Tabelle 3 B. Zur besseren Übersicht der Zellwandzusammensetzung ist bei den einzelnen Stämmen auch der Mureintyp angegeben.

Tab.3B: Zusammensetzung des Zellwandpolysaccharids und Mureintyp bei verschiedenen Bifidobakterien.
 +) Glc = Glukose, Gal = Galaktose, Rham = Rhamnose, a.Z. = andere Zucker
 ++) Ref.St. = Referenzstamm.

Stamm	Zusammensetzung des Zellwand- polysaccharids +) Glc Gal Rham a.Z.			Mureintyp	DNS-Homologie (Scardovi et al., 1970-74) Ref.St.++)	%
B.asteroides C 51	+	+	-	Lys-Gly		
F 392 (minimum)	+	+	+	Lys-Ser		
B.suis SU 859	+	+	(+)	Orn(Lys)-Ser-Ala-Thr-Ala	SU 859	100
B.longum var. animalis C 10-45	+	+	-	Orn(Lys)-Ser-Ala-Thr-Ala	SU 859 B.pseudolongum No 2-10	46 100
ATCC 17930 (A.parabifidus)	+	(+)	-	Orn(Lys)-Ser-Ala-Thr-Ala		n.b.
<u>B.animalis</u>						
R 101-8	-	+	+	Lys(Orn)-Ser-Ala ₂	P 23	99
P 16	+	+	+			98
P 17	+	+	+			92
<u>P 23</u>	+	+	+			100
P 32	(+)	+	+			98
F 437	(+)	+	+			90
<u>B.magnum</u>						
<u>RA 3</u>	+	+	-	Lys(Orn)-Ala ₂ -Ser	RA 3	100
RA 8	+	+	-			n.b.
RA 10	+	+	-			n.b.
RA 76	+	+	-			75
RA 203	+	+	-			106
RA 206	+	+	-			77

Tab.3B - Fortsetzung

Stamm	Zusammensetzung des Zellwandpolysaccharids +)		Mureintyp	DNS-Homologie (Scardovi et al., 1970-74) Ref.St. ++)	
	Glc	Gal Rham a.Z.			%
<u>B.dentium</u>					
B 749	-	+	Orn(Lys)-Asp	B.dentium B 764	69
B 752	-	+			86
B 872	-	+			83
B 1000	-	+			102
B 735	-	+			104
B 1010	(+)	+			97
<u>B.catenulatum</u>					
B 669	-	+	Lys(Orn)-Asp	B 669	100
F 7	+	+			84
B 676	-	+			n.b.
B 684	-	+			n.b.
F 44	+	+			82
F 144	+	+			100
F 171	(+)	(+)			82
<u>B.angulatum</u>					
B 677	-	+	Lys(Orn)-Asp	B 677	100
F 158	+	(+)			95
F 196	+	(+)			90
F 424	+	(+)			76
F 426	+	(+)			83
F 406	+	(+)			80

Tab.3B - Fortsetzung

Stamm	Zusammensetzung des Zellwandpolysaccharids ⁺)			Mureintyp	DNS-Homologie (Scardovi et al., 1970-74) Ref.St. ⁺⁺)	%
<u>B.pseudolongum</u>						
PNC-2-9G						
28 T	+	+	-	Orn(Lys)-Ala ₃	B.globosum RU 230	70 n.b.
SRT	+	+	-			70
Mo 2-10	-	+	6-Desoxytalose			65
	(+)	+	-			
<u>B.globosum</u>						
RU 230	Spur	+	-		RU 230	100
RU 224	Spur	+	-			78
<u>Subtile-Gruppe</u>						
F 395	+	+	-	Lys-Asp	F 395	100
<u>B.spec.</u>						
P 6	+	+	-			n.b.
B 618(B.adolescent.)	+	+	-	Lys(Orn)-Ser-Ala ₂		n.b.
<u>B.adolescentis</u>						
RU 424	(+)	+	-	Orn(Lys)-Asp	B.adolescentic c E 298 b	95
F 5	(+)	+	-			83
F 161	+	+	-			98
F 250	+	+	-			81
F 283	+	+	-			95
F 337	+	+	-			75
F 41	+	+	-			85
F 359	+	+	-			80
ATCC 15423 (A.eriksonii)	-	+	-			n.b.

Tab.3B - Fortsetzung

Stamm	Zusammensetzung des Zellwandpolysaccharids +) Glc Gal Rham a.Z.		Mureintyp	DNS-Homologie (Scardovi et al., 1970-74) Ref.St. ++)	%
<u>B.indicum</u> C 410	-	+	Lys-Asp	B.coryneforme C 215	60
<u>B.coryneforme</u> C 215/24	-	+	Lys-Asp	B.indicum C 410	60
<u>B.thermophilum</u> P 2-91 14-44 P 16-6 Nissin C3/12	+	+	Orn(Lys)-Glu	B.ruminale RU 326	60 72(53) 70 62 n.b.
<u>B.ruminale</u> RU 326 RU 442 RU 445 RU 279	(+) (+) (+) +	+	Orn(Lys)-Glu	RU 326	100 100 96 62

Wie bei Koch (1969) traten auch bei uns nur Glukose, Galaktose, Rhamnose und selten 6-Desoxytalose auf, die auf Grund ihrer R_f -Werte bei der papierchromatographischen Auftrennung auf Parallelchromatogrammen in den Laufmittelsystemen III und IV angesprochen wurden. Wie die Tabelle 3 B zeigt, ist die Zuckerzusammensetzung des Polysaccharids bei den Stämmen, die jeweils einer Art angehören, meist relativ einheitlich. Bei einigen Arten war nur der Typstamm verfügbar, so daß in diesen Fällen die Einheitlichkeit der Zusammensetzung nicht nachgeprüft werden konnte.

Die Variationsmöglichkeit bei nur drei Zuckerbestandteilen ist nicht sehr hoch. Von den 8 theoretischen Kombinationsmöglichkeiten sind bei den Bifidobakterien 4 verwirklicht. Quantitative Unterschiede und das seltenere Auftreten von 6-Desoxytalose, Fucose oder Ribose wurden bei dieser Übersetzung nicht berücksichtigt. Im allgemeinen ist die Zusammensetzung des Polysaccharids im Gegensatz zum Mureintyp mehr stammspezifisch als artspezifisch.

In keinem Fall konnten wir das Vorkommen von Ribit oder Glycerin feststellen. Koch (1969) konnte nur bei wenigen Stämmen von *B. bifidum* und *B. adolescentis* Glycerin und auch einen erhöhten Phosphatgehalt von über 2,5 % finden. Dies zeigt, daß Teichonsäuren durchaus am Aufbau der Zellwände der Bifidobakterien beteiligt sein können und damit ein weiteres chemotaxonomisches Merkmal darstellen, das möglicherweise für die Unterscheidung von Unterarten bedeutsam ist.

2. Nachweis und Charakterisierung verschiedener Enzyme des katabolischen Stoffwechsels der Bifidobakterien.

2.1. Die NAD-abhängige, FDP-regulierte L-LDH.

NAD-abhängige, allosterisch durch FDP regulierte L-LDH wurden zuerst durch Wolin (1964) bei Streptokokken, dann auch bei verschiedenen anderen Bakterien, z.B. bei *L. casei* (de Vries und

Stouthamer, 1970), bei *L. curvatus*, *L. xylosus* und *L. sake* (Stetter, 1973), bei *St. epidermidis* (Schleifer und Kocur, 1973), bei fermentativen Mycoplasmen (Neimark und Lemcke, 1972) und bei Bifidobakterien (de Vries und Stouthamer, 1967; 1968; Veerkamp, 1969), gefunden.

Der Nachweis des Enzyms bei Bifidobakterien beschränkte sich bisher ausschließlich auf solche Arten, die aus dem Darm des Menschen stammen. Wir wollten daher prüfen, ob die gleiche LDH auch bei den zahlreichen neuen Arten aus dem tierischen Intestinaltrakt und aus Abwasser vorhanden ist.

Die vergleichenden Untersuchungen zeigten, daß alle Bifidobakterien als einzige LDH eine NAD-abhängige, FDP-regulierte L-LDH besitzen. Tabelle 4 zeigt die spezifische Aktivität (U/mg) der LDH im zellfreien Extrakt verschiedener Stämme. In allen Fällen war die Aktivität strikt FDP-abhängig.

2.1.1. Allgemeine Charakterisierung.

a) Einfluß von Phosphat auf die Stabilität.

2 ml-Proben des gleichen Rohextrakts wurden 12 Stunden in Phosphatpuffer pH 7,5 und zum Vergleich in Trispuffer pH 7,5 dialysiert und anschließend die spezifische Aktivität ermittelt.

Wie die Tabelle 5 zeigt, nimmt die Aktivität der LDH von *B. adolescentis* bei der Dialyse in Trispuffer gegenüber der in (0,01 M) Phosphatpuffer drastisch ab. Dies zeigt, daß schon eine relativ niedrige Phosphatkonzentration zur Stabilisierung der LDH bei der Dialyse ausreicht.

Dieselbe LDH wird andererseits sofort inaktiviert (84 % Verlust nach 2 Stunden), wenn in Phosphatpuffer (0,1 M) bei pH 8 dialysiert wird, wenn also der pH-Wert für die Stabilität der LDH zu alkalisch ist. Die LDH wird aber ebenso rasch reaktiviert, wenn anschließend bei pH 7 in Phosphatpuffer weiter dialysiert wird. Dies zeigt, daß der stabilisierende Einfluß von Phosphat durch den pH-Wert modifiziert wird.

Tab.4: Vergleich der spezifischen Aktivität der L-LDH
in zellfreien Extrakten verschiedener Bifidobakterien.
Aktivitätstest: Standardtest in 0,1 M Trispuffer
pH 7,5, Reaktionsrichtung von Pyruvat zu L-Laktat.

	Spez. Aktivität (U/mg)
<i>B. bifidum</i> E 319 f ⁺)	0,29
<i>B. infantis</i> S 12 ⁺)	0,41
<i>B. liberorum</i> S 76 e ⁺)	0,43
<i>B. breve</i> S 1 ⁺)	0,70
<i>B. parvolorum</i> S 50 ⁺)	0,67
<i>B. asteroides</i> C 51	1,28
<i>B. suis</i> ⁺)	0,46
<i>B. longum</i> ATCC 15707	0,52
<i>B. longum</i> W 1	0,70
<i>Actinomyces parabifidus</i> ATCC 17930	0,11
<i>B. thermophilum</i> P 2-91	1,50
<i>B. ruminale</i> RU 326	1,61
<i>B. adolescentis</i> ATCC 15703	2,90
<i>Actinomyces eriksonii</i> ATCC 15423	2,30
<i>B. adolescentis</i> RU 424	1,40
<i>B. indicum</i> C 410	0,50
<i>B. coryneforme</i> C 215/24	0,66
<i>B. pseudolongum</i> PNC-2-9G	0,35
<i>B. globosum</i> RU 224	0,80
<i>B. animalis</i> R 101-8	2,40

⁺) = Zellaufschluß erfolgte mit der French-press (Aminco)
bei 20000 PSI.

Tab.5: Vergleich der Einflüsse verschiedener Dialysebedingungen auf die Aktivität der LDH von B.adolescentis ATCC 15703.

Enzym: Ammonsulfatfraktion (40-60%). Aktivitätstest: Standardtest. Pyruvat zu Laktat.

Dialysebedingungen:

- 1) 12 Stunden gegen 0,01 M Phosphatpuffer pH 7,5
- 2) 12 Stunden gegen 0,1 M Trispuffer pH 7,5
- 3) 2 Stunden gegen 0,1 M Phosphatpuffer pH 8,0
- 4) Wie 1, dann gegen 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,1, 2 Stunden.

Behandlung der Probe:	spez.Akt. U/mg	% Steigerung des Umsatzes mit 4,3 mM Mg ⁺⁺ (Ca ⁺⁺ , Mn ⁺⁺)
nicht dialysiert	3,31	0,0
dialysiert gemäß 1)	3,00	0,0
dialysiert gemäß 2)	0,39	200 bis 300
dialysiert gemäß 3)	0,52	0,0
dialysiert gemäß 4)	3,30	0,0

Bei der LDH von B.catenulatum prüften wir die Phosphatabhängigkeit der Stabilität genauer nach. Die Versuche wurden bei pH 6,5 und 7,5 durchgeführt. Hierbei wurden jeweils mehrere 1-ml-Proben vom gleichen Rohextrakt parallel in Wasser, in Imidazolpuffer (pH 6,5), in Trispuffer (pH 7,5) und in Phosphatpuffer (pH 6,5 und 7,5) dialysiert. Nach verschieden langer Dialysedauer wurden Proben entnommen und die spezifische Aktivität ermittelt.

Wie die Kurve a in Abb. 3 zeigt, nimmt die Aktivität bei der Dialyse in Wasser (Imidazol- oder Trispuffer; identische Kurven) nach einem Tag etwa um die Hälfte ab, während in Phosphatpuffer (Kurve e) kaum Verlust eingetreten ist. Nach 2 bis 3 weiteren Tagen fällt die Aktivität der in Wasser (Imidazol-

oder Trispuffer) dialysierten Proben bis auf etwa 10 % ab. In Phosphatpuffer dagegen beträgt der Verlust nach sogar 5 Tagen nur 15 %.

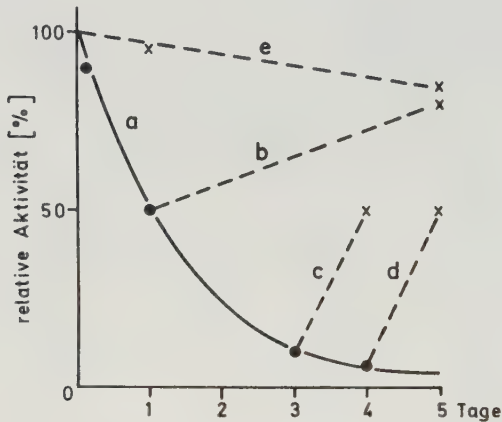


Abb.3: Die Aktivität der LDH von *B.catenulatum* B 676 in Abhängigkeit von verschiedenen Dialysebedingungen.

Dialysebedingungen (ohne Mercaptoäthanol):

- a) Dialyse in Wasser, Imidazolpuffer (0,01 M; pH 6,5) oder Trispuffer (0,03 M; pH 7,5),
- b) 1 Tag in Wasser, anschließend 4 Tage in Phosphatpuffer (0,01 M; pH 6,5 oder 7,5) dialysiert,
- c) 3 Tage in Wasser, anschließend 1 Tag in Phosphatpuffer (0,01 M; pH 6,5 oder 7,5) dialysiert,
- d) 4 Tage in Wasser, anschließend 1 Tag in Phosphatpuffer (0,01 M; pH 6,5 oder 7,5) dialysiert,
- e) 1 bis 5 Tage in Phosphatpuffer (0,01 M; pH 6,5 oder 7,5) dialysiert.

Nach Beendigung der Dialyse wurde die Aktivität gemessen (Standardtest).

—•—•—•— Wasser, Imidazol- oder Trispuffer

—x—x—x— Phosphatpuffer

Ersetzt man andererseits nach 1, 3 oder 4 Tagen bei den in Wasser dialysierten Proben das Wasser durch Phosphatpuffer, so tritt beachtliche Reaktivierung ein (Kurven b, c, d in Abb. 3).

Diese Versuche zeigen, daß Phosphat zur Stabilisierung der LDH notwendig ist, denn in Abwesenheit von Phosphat tritt Inaktivierung ein, die jedoch nach Phosphatzugabe wenigstens teilweise reversibel ist. Zur Stabilisierung reichen in der Regel 0,01 M Phosphat aus (bei *B. longum*, *A. parabifidus*, *B. adolescentis*, *B. catenulatum*, *A. eriksonii*, *B. animalis*, *B. thermophilum*, *B. suis*). Die LDH von *B. pseudolongum* erwies sich dagegen als empfindlicher, da sie nur in Gegenwart von 0,1 M Phosphat (pH 7,5) stabil war.

b) Hitzestabilität.

0,5 ml der aktivsten Ammonsulfatfraktion (40-60 %) von *B. adolescentis* wurden in entsprechend vorgewärmten Fiolax-Glasröhrchen 5 min lang bei 60, 65 und 70°C inkubiert, danach sofort in Eis abgekühlt und in der Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert. Im klaren Überstand wurde die spezifische Aktivität und der Verlust an Gesamtaktivität (U) bestimmt.

Tab.6: Hitzestabilität der LDH.

Enzym: 0,5 ml Ammonsulfatfraktion (40-60%) von *B. adolescentis*.
Aktivitätstest: Standardtest Pyruvat zu Laktat.
I, II = 2 Parallelversuche (bei pH 7,5).

Bedingung	Aktivität			% Gesamtaktivität der Kontrolle
	U/ml I	U/ml II	U/mg (II)	
Kontrolle	44,8	44,1	3,4	100
60°C/5 min	50,8	53,6	11,9	100
65°C/5 min	46,2	48,4	13,8	90
70°C/5 min	39,5	37,0	15,4	66

Wie aus Tabelle 6 ersichtlich ist, nimmt die spezifische Aktivität bei der Hitzebehandlung um das 3- bis 5-fache zu. Die Gesamtaktivität ist nach 5-minütiger Inkubation bei 60°C immer noch zu 100 % vorhanden, während der Verlust bei 65°C etwa 10 % und erst bei 70°C ein Drittel der eingesetzten Aktivität beträgt. Die LDH ist also relativ hitzestabil.

Es zeigte sich, daß auch die LDH der anderen Bifidobakterien fünf Minuten lang 60°C ohne Aktivitätsverlust ertragen.

c) pH-Optimum für die Aktivität.

Zur Bestimmung des pH-Optimums wählten wir die LDH von *B.pseudolongum*, *B. adolescentis* und *B. animalis* aus, da sich diese drei Enzyme auch in der elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit unterscheiden (siehe Tab. 8A). Die Aktivität wurde mit dem Standardtest Pyruvat zu Laktat bei Verwendung von MES-Puffer (Morpholinoäthansulfonsäure, $pK_a = 6,15$, nach Good et al., 1966) bestimmt.

Abb. 4 zeigt, daß die LDH von *B.pseudolongum*, *B. adolescentis* und *B. animalis* ein verschiedenes pH-Optimum, nämlich bei pH 5,7, 6,6 und 7,0 besitzen.

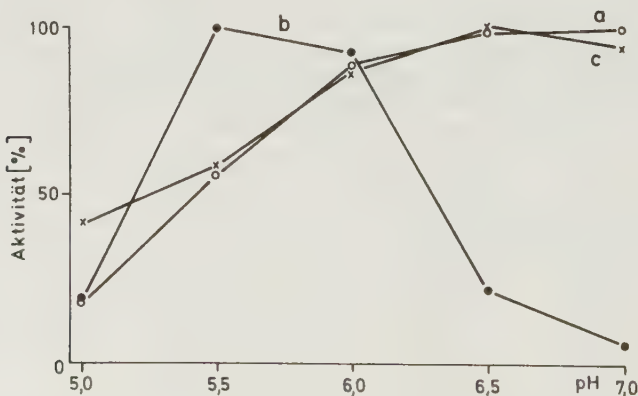


Abb.4: Das pH-Optimum für den LDH-katalysierten Umsatz von Pyruvat in 0,05 M MES-Puffer (5 mM Pyruvat, 1 mM FDP). LDH: a) *B. animalis* R 101-8, b) *B. pseudolongum* PNC-2-9G, c) *B. adolescentis* ATCC 15703.

Spätere kinetische Untersuchungen an der LDH von *B.pseudolongum* zeigten allerdings, daß diese Bestimmung nur mit Einschränkung gilt, denn nicht nur V_m , sondern auch der K_M ist pH-abhängig (siehe unten) und das bedeutet, daß bei verschiedenen pH-Werten unterschiedliche "Sättigungskonzentrationen" an Pyruvat erforderlich sind (siehe Tab.9), um maximalen Umsatz messen zu können. Bei der Aufstellung von Substratsättigungskurven stellte sich nämlich heraus, daß bei pH 5 schon 1 mM Pyruvat genügt, um maximalen Umsatz ($92,5 \% V_m$) messen zu können, während bei 5 mM bereits Substrathemmung ($75 \% V_m$) vorliegt (Abb.9, 10 A). Bei pH 5,5 reichen erst ca. 5 mM Pyruvat zur Sättigung ($95 \% V_m$), während bei pH 6 nur $85 \% V_m$ zu messen sind, so daß hier bei wesentlich höherer Konzentration gemessen werden müßte. Es ist also praktisch unmöglich, mit einer konstanten Konzentration das pH-Optimum bei der Sättigungskonzentration zu bestimmen, so wie das im Normalfall üblich wäre. Ob auch bei den beiden anderen LDH eine solche pH-Abhängigkeit vorliegt, wurde nicht nachgeprüft, so daß eine Verallgemeinerung nicht möglich ist.

Das pH-Optimum für die Rückreaktion von L-Laktat zu Pyruvat wurde in Imidazolpuffern und nur bei der LDH von *B.pseudolongum* bestimmt. Es liegt bei pH 7,5 (Abb. 27).

d) Abhängigkeit der spezifischen Aktivität von der Proteinkonzentration.

Zur Bestimmung der Umsätze durch sehr aktive Enzyme muß im allgemeinen die Enzymlösung verdünnt werden. Bei der LDH einiger Bakterien, z.B. bei *Bacillus subtilis* (Yoshida, 1965) oder bei *St. epidermidis* (unveröffentlichtes Ergebnis), tritt jedoch beim Verdünnen ein Verlust an spezifischer Aktivität ein.

Bei Bifidobakterien ist dies nicht der Fall, denn wie aus Abb.5 stellvertretend bei der LDH von *B.animalis* hervorgeht,

hängt die spezifische Aktivität nicht von der eingesetzten Proteinmenge ab. In allen Fällen war es möglich, mit verdünnten Lösungen (0,05 bis 0,2 mg Protein pro ml Lösung) zu arbeiten.

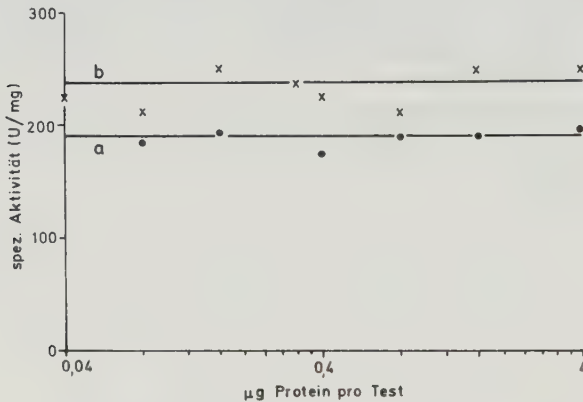


Abb.5: Die spezifische Aktivität der LDH von *B. animalis* R 101-8 in Abhängigkeit von der getesteten Proteinmenge. Aktivitätstest mit 5 mM Pyruvat und 1 mM FDP. Enzym: 70-fach angereicherte LDH. Puffer: a) 0.05 M Phosphatpuffer pH 6; b) 0,05 M MES-Puffer pH 6.

2.1.2. Anreicherung.

Tabelle 7 gibt einen Überblick über den Reinigungsvorgang der LDH von *B. animalis*.

Tab.7: Reinigung der LDH von *B. animalis* R 101-8.

Reinigungsschritt	Protein mg	Aktivität		Anrei- cherung
		U	U/mg	
Rohextrakt	384	1120	2,9	1
I. Ammonsulfatfällung I	162	1020	6,7	2,3
II. Hitzefraktionierung	71	810	11,4	3,9
III. Ammonsulfatfällung II	21,7	590	27,2	9,4
IV. Ecteola-Säule	1,04	208	200	69

Bei *B. adolescentis* wurden nur die ersten beiden Anreicherungs-schritte durchgeführt (4-fache Anreicherung). Bei *B. pseudolongum* wurde auch Schritt IV versucht (20-fache Anreicherung), doch erwies sich die LDH bei der anschließenden Lagerung als nicht stabil.

Bei anderen Arten führten wir außer Schritt I keine weiteren Anreicherungen durch.

2.1.3. Allosterische Eigenschaften.

Den allosterischen Einfluß von Pyruvat und FDP untersuchten wir nur bei der LDH von *B. animalis*, *B. pseudolongum* und *B. adolescentis*, deren LDH sowohl in der elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit als auch im pH-Optimum voneinander zu unterscheiden sind (Tab. 8 A).

Tab.8 A: Vergleich einiger Eigenschaften der NAD-abhängigen, FDP-regulierten L-LDH verschiedener Bifidobakterien.

Stamm	Eigenschaften der LDH		
	Moleku- lar- gewicht	Elektro- phoret. Mobilität	pH- Optimum
<i>B. animalis</i> R 101-8	138 000	3,4	7,0
<i>B. pseudolongum</i> PNC-2-9G	107 000	5,6	5,7
<i>B. adolescentis</i> ATCC 15703	n.b. *)	4,5	6,6
<i>B. longum</i> E 194 b	90 000	4,5	n.b.

*) Die LDH besitzt das gleiche Elutionsmaximum wie Dextran-brau 2000 (MG: 2 000 000). Offenbar geht die LDH mit dem Farbstoff einen Komplex ein, so daß das Molekulargewicht der LDH nicht bestimmt werden konnte.

a) Der Einfluß von Pyruvat.

Wir bestimmten bei den drei Enzymen die Aktivität in Tris-puffer bei pH 7,5 (de Vries et al., 1967) in Abhängigkeit von der Pyruvatkonzentration. Bei der LDH von *B. pseudolongum*, deren pH-Optimum relativ weit im Sauern liegt, prüften wir außerdem das Verhalten im sauren pH-Bereich.

Die bei pH 7,5 erhaltenen Pyruvatsättigungskurven (Abb. 6, 7, 8) besitzen in allen drei Fällen sigmoiden Charakter und ergeben daher in der doppelt reziproken Darstellung (Lineweaver und Burk, 1934) nur gekrümmte Kurven anstelle von Geraden, wie sie bei einfacher Michaelis-Menten-Kinetik auftreten. Die Sigmoidität ist bei *B. pseudolongum* am stärksten ausgeprägt, nimmt jedoch zum Sauern hin ab (Abb. 9). Bei pH 5,5 und 5,0 (Abb. 10 A, B) ist sogar ein hyperbolischer Kurvenverlauf verwirklicht*).

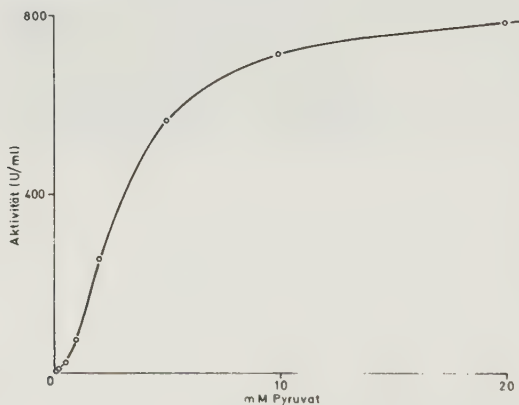


Abb. 6: Pyruvatsättigungskurve der LDH von *B. animalis* R 101-8 bei pH 7,5 in 0,1 M Trispuffer (mit 1 mM FDP und 0,4 mM NADH). Enzym: 4-fach angereicherte LDH.

*) Die naheliegende Frage, ob das Ausmaß der Sigmoidität bei den drei LDH in Relation zum pH-Optimum steht, scheint nur bei *B. pseudolongum* bejaht werden zu können, denn bei *B. adolescentis* trat in einem nachträglichen Versuch bei pH 6,8, also beim pH-Optimum, nur ein sigmoider Verlauf der Substratsättigungskurve auf.

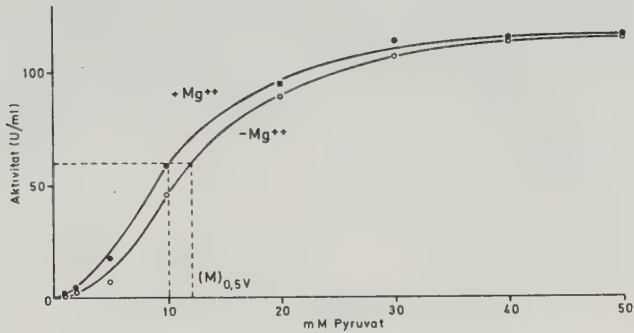


Abb. 7: Pyruvatsättigungskurve der LDH von *B.pseudolongum* PNC-2-9G bei pH 7,5 in 0,1 M Trispuffer mit 4,3 mM und ohne Mg⁺⁺. Aktivitätstest mit 1 mM FDP und 0,4 mM NADH. Enzym: 4-fach angereicherte LDH.



Abb. 8: Pyruvatsättigungskurve der LDH von *B.adolescentis* ATCC 15703 bei pH 7,5 in 0,1 M Trispuffer. Aktivitätstest mit 1 mM FDP und 0,4 mM NADH. Enzym: 4-fach angereicherte LDH.

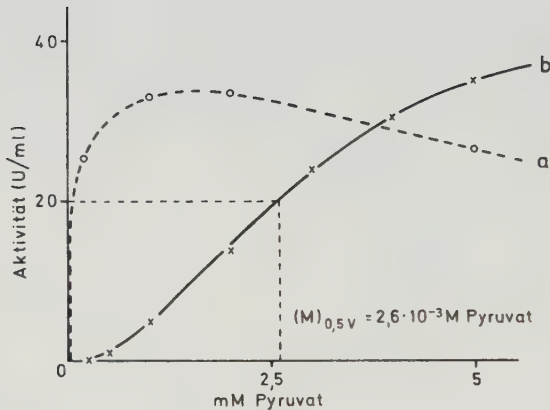


Abb. 9: Vergleich der Pyruvatsättigungskurven der LDH von *B.pseudolongum* PNC-2-9G bei pH 5 und 6 in 0,05 M MES-Puffer mit 1 mM FDP.
Enzym: 20-fach angereicherte LDH.
a) bei pH 5,0 b) bei pH 6,0.

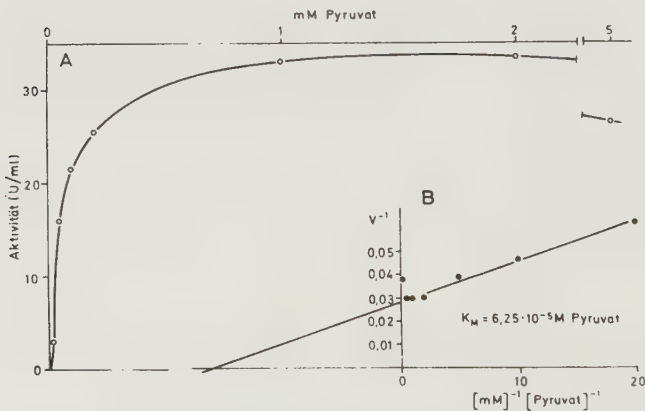


Abb. 10: A) Pyruvatsättigungskurve der LDH von *B.pseudolongum* PNC-2-9G bei pH 5 in MES-Puffer mit 1 mM FDP.
Enzym: wie Abb. 9
B) Doppelt reziproke Darstellung der Substratbeziehung.

Die Affinität zu Pyruvat ist ebenfalls bei der LDH von *B.pseudolongum* pH-abhängig. Die Sättigungskonzentrationen bei halbmaximaler Umsatzgeschwindigkeit (ausgedrückt durch den k_M bzw. durch den $(M)_{0.5V}$ -Wert, den sog. "Pseudo- K_M " bei sigmoiden Substratsättigungskurven) betragen nämlich bei pH 7,5 etwa 11 mM Pyruvat, bei pH 6 dagegen nur 3 mM. Die gleiche Halbsättigungskonzentration tritt bei *B.animalis* und *B.adolescentis* schon bei pH 7,5 auf (Tab.8 B).

Die Sigmoidität der Substratsättigungskurven (pH 7,5) drückt sich auch im Anstieg n der Hill-Geraden*) in Abb. 11 aus, der über 10 % V_m beim Wert 2 liegt (bei *B.pseudolongum* ist n sogar gleich 2,4), so daß mindestens 2 cooperative Bindungsstellen für Pyruvat am Enzym anzunehmen sind (positiv homotrope Cooperativität). Unter 10 % V_m ist die Cooperativität nicht mehr voll verwirklicht, da die Punkte nicht mehr auf der Geraden liegen (gestrichelte Linie).

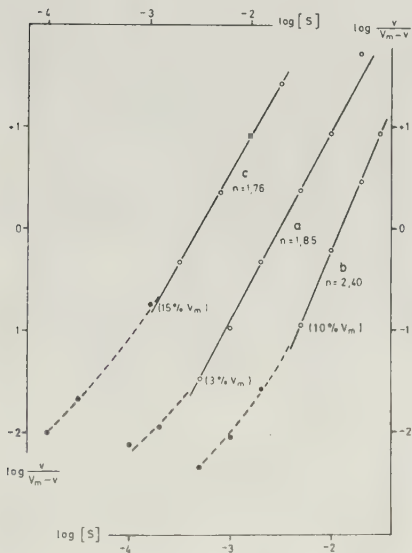


Abb.11:

Hill-Darstellung der Pyruvatbeziehung der LDH von
a) *B.animalis* R 101-8,
b) *B.pseudolongum* PNC-2-9G und
c) *B.adolescentis* ATCC
bei pH 7,5. Test siehe
Abb.6, 7, 8.

*) Der Hill-Darstellung liegt die Gleichung $\log \frac{v}{V_m - v} = n \cdot \log S - n \cdot \log k$ zugrunde (Atkinson, 1966).
($v, (V_m)$ = gemessener (maximaler) Umsatz, n = Ordnungszahl der Reaktion, S = Substratkonzentration (M), k = Gleichgewichtskonstante der Reaktion).

Tab. 88: Zusammenfassung und Übersicht über Liganden-Beziehungen der NAD-abhängigen, FDP-regulierten L-LDH verschiedener Bifidobakterien. - Reaktion: Pyruvat $\rightarrow$ Laktat (physiologische Reaktionsrichtung).
 Bezeichnungen: n = Anstieg der Hill-Geraden; K_M = Michaelis-Konstante; (M) $_{0,5V}$ = "Pseudo- K_M " (nur bei Sigmoidität aus der Ligandenättigungskurve graphisch ermittelbare Ligandenkonzentration bei 50 % V_m);
 V_m = maximale Reaktionsgeschwindigkeit; n.b. = nicht bestimmt.

Stamm	Anreicherungsmedium für d.LDH	Testpuffer	Ligandenbeziehung (jeweils)		2 Bindungsstellen am Enzym	
			Pyruvat (M)		FDP (M)	NADH (M)
B. animalis R 101-8	70	0,05 M Imidazol pH 7,5	(M) $_{0,5V}$ = $1,7 \times 10^{-3}$; V_m = 210 U/mg;		K_M = $4,5 \times 10^{-6}$; n = 0,9; (1,2 unter 75 % V_m)	K_M = 10^{-5} ; n = 1,0; (1,5 unter 95 % V_m)
		0,1 M Tris pH 7,5	(M) $_{0,5V}$ = $2,6 \times 10^{-3}$; V_m = 270 U/mg;		n.b.	n.b.
		0,1 M Tris pH 7,5	(M) $_{0,5V}$ = 3×10^{-3} ;			n.b.
B. pseudolongum PNC-2-9G	4	0,1 M Tris pH 7,5	(M) $_{0,5V}$ = $1,2 \times 10^{-2}$; V_m = 120 U/ml;		K_M = 10^{-4} ; n = 1,1; (1,5 unter 35 % V_m)	n.b.
		+4,3 mM Mg ⁺⁺	(M) $_{0,5V}$ = 10^{-2} ; V_m = 120 U/ml;		K_M = $8,7 \times 10^{-5}$; n = 1,0; (1,5 unter 40 % V_m)	n.b.
		0,05 M MES pH 6,0	(M) $_{0,5V}$ = $2,6 \times 10^{-3}$; V_m = 14,6 U/mg;		K_M = $1,6 \times 10^{-6}$; n = 1,0; (1,2 unter 25 % V_m)	n.b.
15		0,05 M MES pH 5,0	K_M = $6,25 \times 10^{-5}$; n = 1,0; V_m = 15,4 U/mg;		n.b.	n.b.
		+4,3 mM Mg ⁺⁺	K_M = $2,0 \times 10^{-4}$; n = 1,25; V_m = 27 U/mg;		n.b.	n.b.
		0,05 M MES pH 5,5	K_M = $2,2 \times 10^{-4}$; n = 1,0; V_m = 120 U/ml;		K_M = $1,9 \times 10^{-7}$; n = 1,0;	n.b.
B. adolescentis ATCC 15703	4	+4,3 mM Mg ⁺⁺	K_M = $3,3 \times 10^{-4}$; V_m = 140 U/ml;		n.b.	n.b.
		0,1 M Tris pH 7,5	(M) $_{0,5V}$ = $3,2 \times 10^{-3}$;		K_M = 5×10^{-6} ; n = 1,0; (1,3 unter 45 % V_m)	n.b.

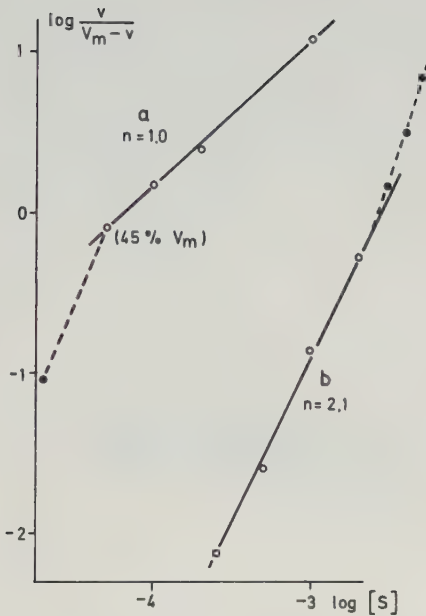


Abb.12:

Hill-Darstellung der
Pyruvatbeziehung der
LDH von *B.pseudolongum*
PNC-2-9G bei pH 5 und 6.
a) bei pH 5,0,
b) bei pH 6,0.
Test siehe Abb. 9

Bei pH 5 (*B.pseudolongum*) ist der Anstieg n über 45 % V_m gleich 1.0 (Abb.12), d.h. in diesem Bereich liegt Michaelis-Menten-Kinetik vor. Unter diesem Bereich, also bei Konzentrationen unter $5 \times 10^{-5}M$ Pyruvat, nimmt der Anstieg der Hill-Geraden (bzw. die Cooperativität) zu (gestrichelte Linie), so daß der hyperbolische Kurvenverlauf der Sättigungskurve (Abb. 10 A) offenbar nicht voll verwirklicht ist.

b) Der Einfluß von FDP.

Wir bestimmten zunächst die Aktivität in Trispuffer bei pH 7,5 in Abhängigkeit von der FDP-Konzentration. Bei der LDH von *B. pseudolongum* führten wir noch einen weiteren Versuch bei pH 6 durch.

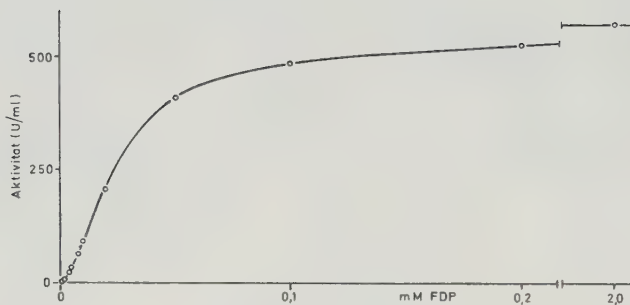


Abb. 13: FDP-Sättigungskurve der LDH von *B. animalis* R 101-8 bei pH 7,5 in 0,1 M Trispuffer. Aktivitätstest mit 5 mM Pyruvat und 0,4 mM NADH. Enzym: 4-fach angereicherte LDH.

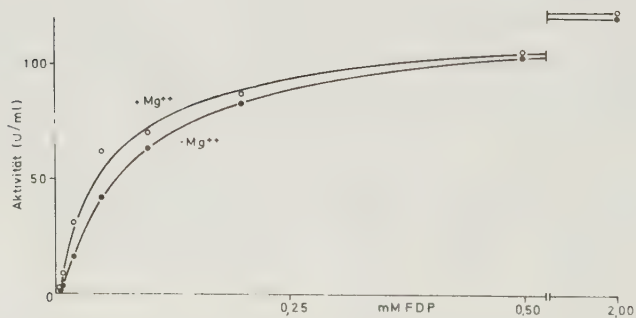


Abb. 14: FDP-Sättigungskurve der LDH von *B. pseudolongum* PNC-2-9G bei pH 7,5 in 0,1 M Trispuffer mit 4,3 mM und ohne Mg⁺⁺. Aktivitätstest mit 15 mM Pyruvat und 0,4 mM NADH. Enzym: 4-fach angereicherte LDH.

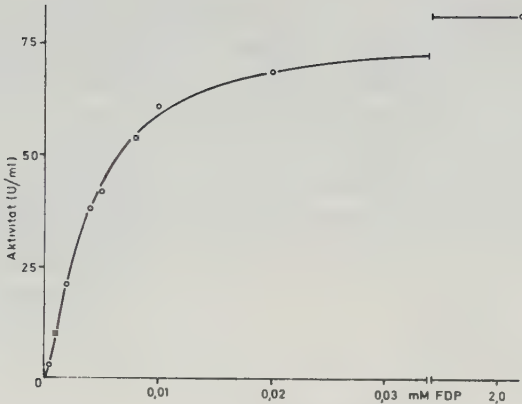


Abb. 15: FDP-Sättigungskurve der LDH von *B.adolescentis* ATCC 15703 bei pH 7,5 in 0,1 M Trispuffer. Aktivitätstest mit 5 mM Pyruvat und 0,4 mM NADH. Enzym: 4-fach angereicherte LDH.

Die bei pH 7,5 erhaltenen FDP-Sättigungskurven (Abb. 13, 14, 15) besitzen ebenfalls wie die Pyruvatsättigungskurven sigmoiden Charakter, der aber längst nicht so ausgeprägt ist wie bei diesen. Bei den FDP-Kurven ist nämlich im Gegensatz zu den Pyruvat-Kurven im Sättigungsbereich ein hyperbolischer Kurvenverlauf (Michaelis-Menten-Kinetik) vorhanden. Dies geht insbesondere aus den Hill-Darstellungen (Abb. 16) hervor. Bei *B. animalis* beginnt dieser Bereich ($n = 1$) bei etwa 70 % V_m , bei *B. pseudolongum* bei 35 % V_m und bei *B.adolescentis* bei 45 % V_m . Im unteren Bereich dagegen ist der Anstieg n größer als eins.

Dem hyperbolischen Bereich der Sättigungskurven entspricht die bei der doppelt reziproken Darstellung auftretende Gerade (Abb. 17). Im unteren Konzentrationsbereich werden dagegen nach oben gekrümmte Kurven sichtbar (gestrichelte Linien).

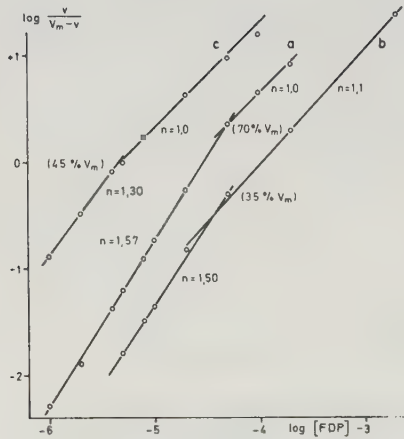


Abb. 16:

Hill-Darstellung der FDP-Beziehung der LDH von

- a) *B. animalis*,
 - b) *B. pseudolongum* und
 - c) *B. adolescentis*
- bei pH 7,5.

Test siehe Abb.13,14,15.

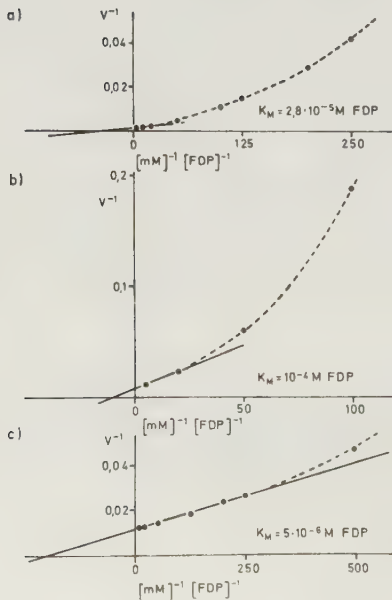


Abb. 17:

Doppelt reziproke Darstellung der FDP-Beziehung der LDH von

- a) *B. animalis*,
 - b) *B. pseudolongum* und
 - c) *B. adolescentis*
- bei pH 7,5.

Test siehe Abb.13,14,15.

Die Sigmoidität der FDP-Kurven nimmt bei *B.pseudolongum* analog zu den Pyruvat-Kurven zum Säuren hin ab, ist also pH-abhängig. Dies ist aus dem Versuch bei pH 6 im Vergleich zu dem bei pH 7,5 zu entnehmen (Abb. 14, 18 A, 18 B). Die Hill-Darstellung (Abb. 19) weist auf eine im gesamten Testbereich verwirklichte Michaelis-Menten-Kinetik hin ($n = 1$). Dementsprechend tritt bei der doppelt reziproken Darstellung (Abb. 18 B) nur eine Gerade auf.

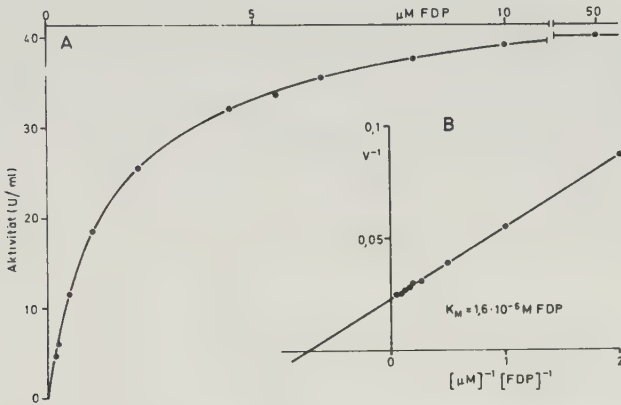


Abb. 18: A) FDP-Sättigungskurve der LDH von *B.pseudolongum* PNC-2-9G bei pH 6 in 0,05 M MES-Puffer. Aktivitätstest mit 5 mM Pyruvat und 0,4 mM NADH. Enzym: 20-fach angereicherte LDH.

B) Doppelt reziproke Darstellung der FDP-Beziehung bei pH 6.

Die Affinität zu FDP ist ebenfalls pH-abhängig, d.h. analog zum K_M für Pyruvat nimmt der für FDP zum Säuren hin ab und die Affinität dementsprechend zu. Der K_M beträgt nämlich bei pH 7,5 für *B. pseudolongum* 100 $\mu\text{M FDP}$, bei pH 6 dagegen nur etwa 2 μM und bei pH 5,5 sogar nur noch 0,19 μM (Tab. 8 B).

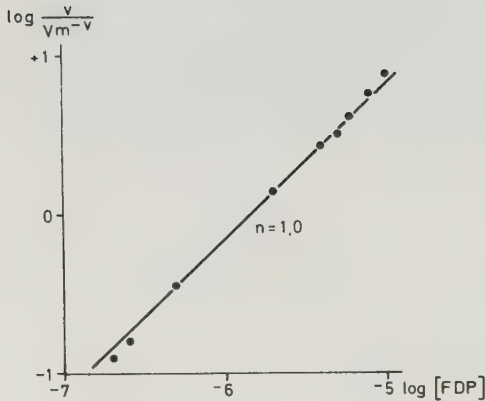


Abb. 19 :

Hill-Darstellung der FDP-
Beziehung der LDH von
B.pseudolongum PNC-2-9G
bei pH 6 in 0,05 M MES-
Puffer.

Test wie Abb. 18

Für *B. animalis* ergab sich bei pH 7,5 ein K_M von 28 μM FDP; bei *B. adolescentis* ist der K_M gleich 2 μM FDP, also besonders niedrig. Die Affinität ist aber bei diesen beiden LDH wohl nur deshalb höher als die bei *B. pseudolongum*, da deren pH-Optimum näher bei pH 7,5 liegt, wobei vorauszusetzen ist, daß die Affinität bei allen drei LDH pH-abhängig ist, obwohl dies nur bei *B. pseudolongum* nachgeprüft wurde.*)

*) Nachträgliche Versuche in MES-Puffer bei pH 6,5 zeigten, daß bei *B. adolescentis* auch ohne FDP 60 bis 70 % an V_m , bei *B. animalis* etwa 50 % V_m (mit 10 mM Pyruvat im Testgemisch) erreicht werden, während bei *B. pseudolongum* ohne FDP Umsätze von weniger als 2 % V_m auftreten, die nur dann zu messen sind, wenn sehr hohe Enzymkonzentrationen eingesetzt werden. Alle Umsätze ohne FDP beginnen mit einer ausgeprägten "pre-steady-state"-Phase (laeg-Phase).

c) Wirkung von FDP und Pyruvat auf die scheinbare Affinität für Pyruvat bzw. FDP.

Oben ist gezeigt worden, daß die homotropen Wechselwirkungen der Untereinheiten mit sinkendem pH-Wert abnehmen und die Affinität zu den beiden Liganden zunimmt. Die heterotropen Interaktionen bleiben dagegen erhalten, und die LDH der Bifidobakterien benötigt auch im sauren pH-Bereich FDP zur Aktivität.

Der Einfluß eines Effektors auf die Aktivität kann aber verschiedener Art sein, je nachdem, ob die maximale Umsatzgeschwindigkeit (V_m) oder die Affinität (K_M) für das Substrat betroffen ist. In der Theorie wird in dem einen Fall vom V-Typ und im anderen vom K-Typ gesprochen (vgl. Dugal, 1972). Um zu klären, welchem Typ die FDP-Aktivierung der LDH der Bifidobakterien entspricht, führten wir Untersuchungen an der LDH von *B. pseudolongum* (stellvertretend für die LDH der Bifidobakterien) durch.

Wir bestimmten die relative Aktivität bei verschiedenen, konstant gehaltenen FDP-Konzentrationen in Abhängigkeit von der Pyruvatkonzentration (bei pH 5,5).

Wie die doppelt reziproke Darstellung in Abb. 20 zeigt, hängt die Affinität (K_M) für Pyruvat, nicht jedoch die maximale Umsatzgeschwindigkeit (V_m), von der FDP-Konzentration ab. Dieses "partiell kompetitive" Verhalten ist für den K-Typ charakteristisch.

Wie die entsprechende, doppelt reziproke Darstellung (Abb. 21) der FDP-Beziehung bei verschiedenen, konstant gehaltenen Pyruvatkonzentrationen zeigt, hängt von der Pyruvatkonzentration nicht nur die maximale Umsatzgeschwindigkeit (V_m) ab, sondern auch der K'_M für den Effektor FDP. Also modifiziert FDP die scheinbare Affinität der LDH für Pyruvat und umgekehrt Pyruvat jene für FDP, wie das für Enzyme des K-Systems charakteristisch ist (Dugal, 1972).

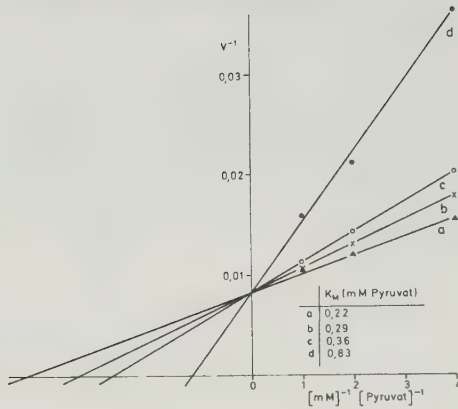


Abb. 20: Abhängigkeit der Affinität für Pyruvat von der FDP-Konzentration bei der LDH von *B.pseudolongum* PNC-2-9G in 0,05 M MES-Puffer pH 5,5.
Enzym: 15-fach angereicherte LDH.
FDP: a) 0,1 mM; b) 0,01 mM; c) 0,002 mM; d) 0,0004 mM.

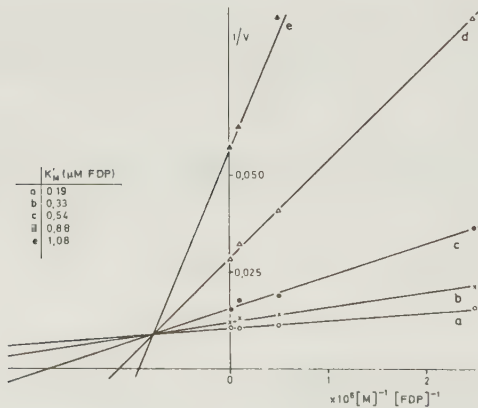


Abb. 21: Abhängigkeit der Affinität für FDP von der Pyruvat-konzentration bei der LDH von *B.pseudolongum* PNC-2-9G bei pH 5,5 in 0,05 M MES-Puffer.
Enzym: wie Abb. 20.
Pyruvat: a) 1 mM; b) 0,5 mM; c) 0,25 mM;
d) 0,1 mM; e) 0,05 mM.

d) Quartärstruktur.

Die 70-fach gereinigte LDH von *B. animalis* ergab bei der Elektrophorese im SDS-Polyacrylamid-Gel eine einzige Proteinbande, die dem Molekulargewicht 38 000 entspricht^{*)}. Da das durch Gelfiltration bestimmte Molekulargewicht der LDH 138 000 beträgt, ist anzunehmen, daß die LDH aus 4 identischen Untereinheiten besteht.

2.1.4. Kompetitive Hemmung durch Phosphat.

In Vorversuchen hatte sich gezeigt, daß die Umsätze in Phosphatpuffer gehemmt sind. Abb. 22 zeigt die Abnahme der spezifischen Aktivität in Abhängigkeit von der Phosphatkonzentration.

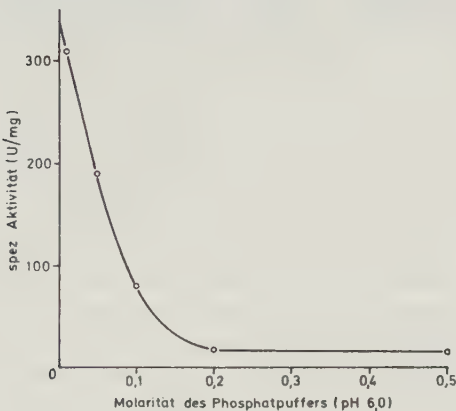


Abb.22: Hemmung der spezifischen Aktivität in verschiedenen molaren Phosphatpuffern bei pH 6. Aktivitätstest mit 5 mM Pyruvat, 1 mM FDP und 0,4 mM NADH. Enzym: 70-fach angereicherte LDH von *B.animalis* R 101-8.

^{*)} Herrn Dr.K.O.Stetter sei für die Bestimmung herzlich gedankt.

In Abb. 23 ist ersichtlich, daß das Ausmaß der Hemmung vom pH-Wert abhängt. Im leicht alkalischen und neutralen pH-Bereich ist der Umsatz in Phosphatpuffer im Vergleich zu anderen Puffern praktisch vollständig gehemmt. Im sauren Bereich ist die Hemmung nicht mehr so offensichtlich.

Wir untersuchten die Art der Hemmung bei der LDH von *B.pseudolongum* genauer. Hierzu wurde die relative Aktivität der LDH bei verschiedenen, konstant gehaltenen Phosphatkonzentrationen bei pH 6 in Abhängigkeit von der FDP-Konzentration bestimmt.

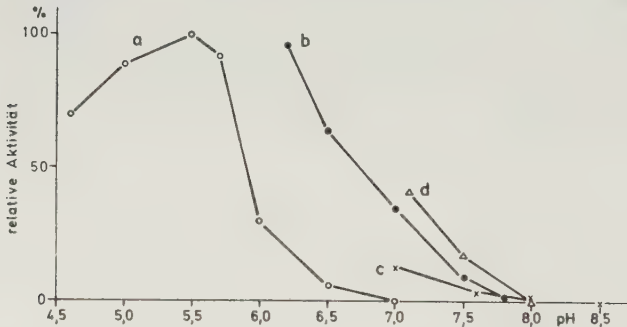


Abb.23: Der Umsatz von Pyruvat durch die LDH von *B.pseudolongum* PNC-2-9G in Abhängigkeit von verschiedenen Puffern und vom pH-Wert.
Aktivitätstest mit 5 mM Pyruvat, 1 mM FDP und 0,4 mM NADH. Enzym: Ammonsulfatfraktion 40-70 %.
Puffer: a) 0,1 M Phosphatpuffer,
b) 0,05 M Imidazolpuffer,
c) 0,1 M Glycylglycinpuffer,
d) 0,1 M Trispuffer.

Wie die Abb. 24 zeigt, wirkt Phosphat gegenüber FDP als kompetitiver Inhibitor, d.h. die maximale Umsatzgeschwindigkeit V_m wird durch Phosphat nicht beeinflusst, wie anhand der Abb. 21 gefolgert werden kann.

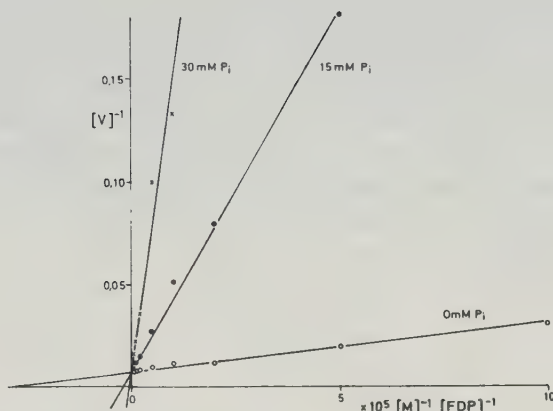


Abb.24: Kompetitive Hemmung des FDP-abhängigen Umsatzes durch Phosphat in 0,05 M MES-Puffer bei pH 6. Pyruvat: 4,8 mM. Enzym: 15-fach angereicherte LDH. Phosphat: a) 0 mM; b) 15 mM; c) 30 mM.

2.1.5. Förderung durch zweiwertige Kationen.

Da bei der FDP-aktivierten L-LDH von *L.casei* (de Vries und Stouthamer, 1970) eine starke Mn^{++} -Abhängigkeit der Aktivität bekannt war, untersuchten auch wir, ob bei der LDH der Bifidobakterien Einflüsse durch Kationen zu beobachten sind. Bei routinemäßiger Überprüfung zellfreier Extrakte zeigte sich, daß die Zugabe von 4,3 mM Mg^{++} zum Standardtestgemisch zu einer deutlichen Umsatzförderung bei der LDH von *B.pseudolongum*, PNC-2-9G und RU 224, führt. Bei anderen Arten konnte nur nach längerer Dialyse in Tris- oder Imidazolpuffer, nicht aber nach Dialyse in Phosphatpuffer, eine Umsatzförderung durch Kationen beobachtet werden (Tab.5).

Da also nur bei der LDH von *B.pseudolongum* ein stärkerer Einfluß durch Kationen zu erkennen war, führten wir bei dieser LDH noch weitere Untersuchungen durch.

a) Die optimale Mg^{++} -Konzentration.

Wir prüften zunächst die Aktivität in verschiedenen Puffern bei pH 7,5 in Abhängigkeit von der Mg^{++} -Konzentration. Wie die Abb. 25 zeigt, ist die Aktivität in Trispuffer bei 8 mM, in Imidazol- und Glycylglycin-Puffer dagegen bei etwa 12 mM Mg^{++} am größten. Die Steigerungsrate ist außerdem auch von der Art des Puffers abhängig. Sie ist in Imidazolpuffer am höchsten.

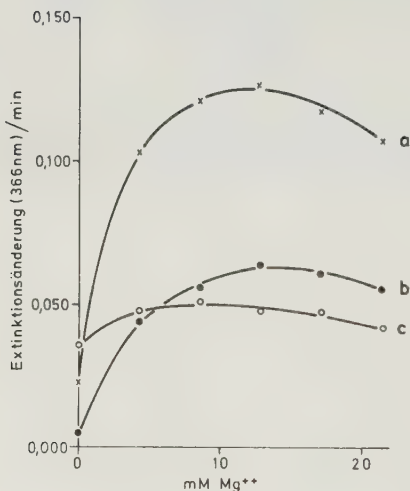


Abb.25:

Die Aktivität der FDP-aktivierten LDH von *B.pseudolongum* PNC-2-9G in Abhängigkeit von der Mg^{++} -Konzentration in verschiedenen Puffern bei pH 7,5.

Aktivitätstest mit 5 mM Pyruvat
1 mM FDP, 0,4 mM NADH.

Enzym: Ammonsulfatfraktion
40-70 %.

Puffer: a) 0,05 M Imidazolpuffer, b) 0,1 M Glycylglycinpuffer, c) 0,1 M Trispuffer.

b) Abhängigkeit vom pH-Wert.

Den Einfluß des pH-Werts auf die Förderung durch 8,6 mM Mg^{++} untersuchten wir in Imidazol- und MES-Puffer (Standardtest Pyruvat zu Laktat). Wie die Abb. 26 zeigt, tritt zwischen pH 5,5 und 6,0, also beim pH-Optimum, keine nennenswerte Steigerung des Umsatzes auf. Nur der Abfall der Aktivitäts-

kurve sowohl zum sauren als auch zum alkalischen pH-Bereich hin erscheint in Anwesenheit von Mg^{++} verzögert.

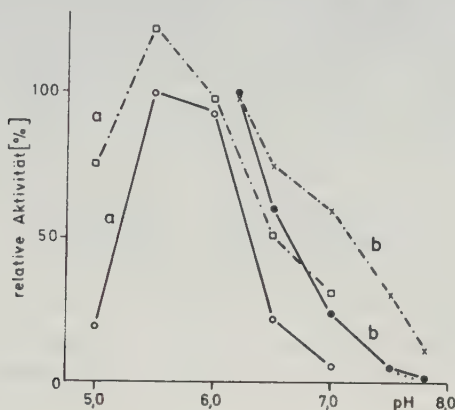


Abb.26: Die Aktivität der FDF-aktivierten LDH von *B.pseudo-longum* PNC-2-9G in Abhängigkeit vom pH-Wert in 0,05 M MES-Puffer (a) bzw. 0,05 M Imidazolpuffer (b) mit 8,6 mM und ohne Mg^{++} . Aktivitätstest mit 5 mM Pyruvat, 1 mM FDP, 0,4 mM NADH. Enzym wie Abb. 25.
 ————— ohne Mg^{++} , - - - - - mit Mg^{++}

Der Umsatz von L-Laktat zu Pyruvat wird ebenfalls durch Mg^{++} beeinflusst. Über pH 7 ist er gehemmt, während darunter eine bis zu 17 %ige Förderung auftritt (Abb.27).

Die pH-Abhängigkeit der Umsatzförderung durch Mg^{++} bei konstantem Einsatz von 5 mM Pyruvat, so wie sie in Abb. 26 dargestellt ist, ist nur die Wiedergabe zweier superponierter Einflüsse von Mg^{++} auf die Parameter K_M und V_m , die ihrerseits pH-abhängig sind (siehe 2.1.1.c und 2.1.3.a). Das oberste Drittel der Tab.9 zeigt also, welcher Sättigungsgrad ($\% V_m$) bei konstantem Einsatz von 5 mM Pyruvat (ohne Mg^{++}) bei verschiedenem pH-Wert jeweils vorliegt. Während bei pH 5,0

sogar Substrathemmung (74 % V_m , vgl. Abb. 9) auftritt, ist bei pH 5,5 praktisch optimale Sättigung erreicht (96 % V_m), die jedoch bei steigendem pH-Wert rasch wieder abnimmt. Das jeweilige Ausmaß der nach Zugabe von Mg^{++} beobachteten Umsatzförderung (vgl. Abb. 26) ist in Tab. 9 ebenfalls ersichtlich.

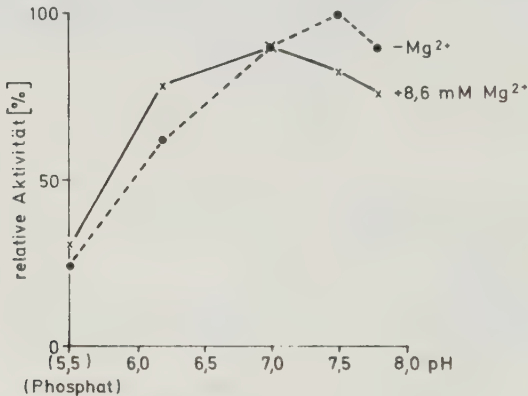


Abb.27: Die Aktivität (nicht-physiologische Reaktionsrichtung) der FDP-aktivierten LDH von *B.pseudolongum* PNC-2-9G in Abhängigkeit vom pH-Wert in 0,05 M Imidazolpuffer mit 8,6 mM und ohne Mg^{++} . Aktivitätstest mit 0,12 M L-Laktat, 1 mM FDP, 3,6 mM NAD. Enzym: wie Abb. 25.

Setzt man nun statt 5 mM Pyruvat die bei jedem pH-Wert zur Sättigung erforderliche Substratmenge (2, 5, 10, 50 mM Pyruvat) ein (94 bis 96 % V_m), so tritt nach Zugabe von Mg^{++} nur bei pH 5,0, nicht aber bei höherem pH-Wert eine wesentliche Umsatzförderung auf (Tab.9), V_m wird also durch Mg^{++} nur im sauren, nicht aber im neutralen oder leicht alkalischen pH-Bereich beeinflusst. Setzt man andererseits Pyruvatkonzentrationen ein, die etwa im Bereich halbmaximaler oder noch geringerer Sättigung liegen, so ist der Umsatz mit oder ohne Mg^{++} im sauren pH-Bereich nahezu gleich, während bei pH 7,5 (Abb.7, Tab.8 B) mit Mg^{++} eine deutliche Umsatzförderung eintritt, deren Ausmaß

noch von der Art des Puffers abhängt, wie oben (siehe 2.1.5.a) bereits gezeigt wurde. Aus diesen Versuchen und aus den entsprechenden Substratsättigungskurven mit und ohne Mg^{++} ist ersichtlich, daß auch die Affinität für Pyruvat beeinflußt wird, und zwar wird sie bei pH 5,0 und 5,5 geringfügig verringert (Tab. 8 B), bei pH 7,5 dagegen erhöht.

Eine genauere Erklärung dieser Mg^{++} -abhängigen Umsatzförderung kann hier jedoch nicht gegeben werden. Man kann nur annehmen, daß durch die Acidität des Kations eine Protonenverschiebung und dadurch konformatorische Veränderungen am Enzym hervorgerufen werden. Solche Einflüsse sind in der Biochemie allgemein bekannt (vgl. Mahler und Cordes (1969), Biological Chemistry, 5. Auflage, S. 250).

Tab.9: Einfluß von Pyruvat auf die Umsatzförderung durch Mg^{++} bei verschiedenem pH-Wert. Aktivitätstest von Pyruvat zu Laktat mit 1 mM FDP in MES- bzw. Tris-Puffer, Enzym: *B. pseudolongum*.

Pyruvat (mM)	Puffer	pH	Aktivität in % V_m (ohne Mg^{++})	
			ohne Mg^{++}	mit 4,3 mM Mg^{++}
5	MES	5,0	74	122
	MES	5,5	96	120
	MES	6,0	85	90
	Tris	7,5	10	18 ^{*)}
2	MES	5,0	94	170
5	MES	5,5	96	120
10	MES	6,0	96	96
50	Tris	7,5	96	97 ^{**)}
0,1	MES	5,0	60	73
	MES	5,5	35	31
	MES	6,0	< 1	< 1

^{*)} 4-fache Umsatzförderung gegenüber der Kontrolle bei Verwendung von Imidazolpuffer pH 7,5.

^{**)} entspricht auch der Umsatzförderung in Imidazolpuffer pH 7,5.

- c) Vergleich des Einflusses verschiedener Kationen auf die L-LDH von *B.pseudolongum* und von anderen Milchsäurebakterien.

Zur Bestimmung der Umsatzförderung durch verschiedene Kationen benutzten wir den Standardtest (Imidazolpuffer pH 7,5). Bei diesem Versuch bezogen wir weitere FDP-regulierte und nicht allosterisch regulierte L-LDH anderer Gattungen von Milchsäurebakterien mit ein, um zu sehen, ob die Kationenwirkung allgemein verbreitet ist. In allen Fällen benutzten wir dialysierte Ammonsulfatfraktionen.

Wie die Tab. 10 zeigt, führen verschiedene, zweiwertige Kationen bei der LDH von *B. pseudolongum*, *L. casei*, *L. curvatus*, *L. sake* und *St. epidermidis* zu einer Förderung bzw. Aktivierung des Umsatzes von Pyruvat zu Laktat. Während aber bei den genannten Laktobazillen die Wirksamkeit ausschließlich auf Schwermetall-Ionen beschränkt ist und diese Ionen zur Aktivierung des Enzyms gemeinsam mit FDP unbedingt erforderlich sind, ist die Kationen-abhängige Förderung bei der LDH von *B.pseudolongum* und *St. epidermidis* unspezifisch. Verschiedene Konzentrationen an K^+ -Ionen führten dagegen zu keiner Förderung (nicht aufgeführt).

Bei der FDP-regulierten L-LDH von *Sc. faecalis* sowie bei den nicht allosterisch regulierten L-LDH von *L. bif fermentans*, *L. fermentum* und *L. plantarum* trat keine Förderung durch Kationen auf.

Tab.10: Vergleich des Einflusses verschiedener Kationen auf verschiedene allosterisch regulierte und nicht regulierte L-LDH in Imidazolpuffer. - pH: wie in der Tabelle angegeben. Enzyme: dialysierte Ammonsulfatfraktionen. Aktivitätstest: Standardtest von Pyruvat zu Laktat.

LDH von	Test-pH	Aktivierung durch					
		FDP 1 ⁺)	M ⁺⁺ (% Aktivität der Kontrolle) 0 -	Mg ⁺⁺ 4,3	Ca ⁺⁺ 4,3	Mn ⁺⁺ 2,0	Fe ⁺⁺ 4,3 mM
B.pseudolongum PNC-2-9G	7,5 6,5	ja ja	100 100	425 109	669 124	350 107	388 n.b.
Sc.faecalis ATCC 8043	7,5	ja	100	100	100	100	100
St.epidermidis CCM 50	7,0	ja ⁺)	100	192	n.b.	n.b.	n.b.
St.epidermidis ATCC 14900	7,0	ja ⁺)	100	138	169	117	n.b.
L.casei 5c	7,5	ja	0	0	0	100 ⁺⁺⁺)	143
L.curvatus ATCC 11146 ⁺⁺)	7,5	ja	0	0	0	100 ⁺⁺⁺)	n.b.
L.curvatus ATCC 11147 ⁺⁺)	7,5	ja	0	0	0	100 ⁺⁺⁺)	n.b.
L.sake ATCC 15578	7,5	ja	0	0	0	100 ⁺⁺⁺)	n.b.
L.bif fermentans	7,5	nein	100	100	101	41	n.b.
L.fermentum	7,5	nein	100	92	69	78	n.b.
L.plantarum 2410	7,5	nein	100	104	108	101	n.b.

⁺) = beim Test der LDH von Staphylokokken wurde nur 0,1 mM FDP statt 1 mM zugesetzt.
⁺⁺) = Die beiden Stämme ATCC 11146 und ATCC 11147 werden bei der ATCC als L.bifidus geführt, sind aber in Wirklichkeit typische Vertreter von L.curvatus (unveröffentlichte Ergebnisse).
⁺⁺⁺) = Da FDP allein zur Aktivierung der LDH nicht ausreicht und die Kontrolle daher keine Aktivität aufweist, wurde willkürlich der Mn⁺⁺-aktivierte Umsatz gleich 100 % gesetzt.

2.1.6. Elektrophoretische Mobilität im Polyacrylamid-Gel.

Die elektrophoretische Beweglichkeit der LDH hat sich als ein für die Taxonomie nützliches Merkmal erwiesen (Gasser, 1970; Stetter, 1973). Daher prüften auch wir die Wanderungsgeschwindigkeit der LDH aller Arten in dem gleichen Disc-elektrophorese-System, in dem Stetter (1973) bei der entsprechenden Untersuchung der Mn^{++} -bedürftigen, FDP-regulierten L-LDH der Streptobakterien erfolgreich war. Als Bezug diente auch bei unserer Untersuchung die Wanderungsgeschwindigkeit des LDH-Isozym-I aus Kaninchenmuskel ($R_I = 5,0$).

Im Gegensatz zur Einheitlichkeit der allosterischen Regulierbarkeit ergab die Gelelektrophorese drei verschieden schnell wandernde LDH innerhalb der Gattung. Die Unterscheidung der einzelnen Arten aufgrund der Mobilität der LDH ist aus Tab. 10 ersichtlich und stellt ein weiteres nützliches Merkmal zur Unterscheidung von Arten innerhalb der Gattung *Bifidobacterium* dar.

2.2. FDP-Aldolase.

Nach Scardovi et al. (1969) zeichnen sich die aus Pansen isolierten Stämme (*B. globosum*) durch den Besitz von Aldolase aus und unterscheiden sich hierdurch von anderen Bifidobakterien. Wir versuchten daher, die spezifische Aktivität dieses Enzyms in zellfreien Extrakten aller Arten zu bestimmen.

Abb. 28 zeigt, daß beim Aldolase-Farbttest mehr oder weniger schwach positive Farbreaktionen auftreten, die aber im Vergleich zu *L. bulgaricus* 20- bis 100-mal niedriger sind (maximal 30 mU/mg Rohextraktprotein). Es erschien wahrscheinlich, daß die schwachen Reaktionen auf andere Spaltungsmechanismen zurückgingen und nicht auf eine schwache Aldolase-Aktivität. Um diese Annahme zu stützen, führten wir weitere Untersuchungen durch.

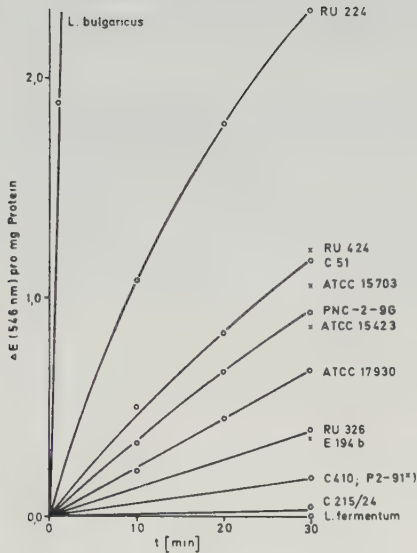


Abb. 28:

Vergleich der Extinktionszunahme im Aldolase-Farbtest bei verschiedenen Bifidobakterien und Lactobazillen. Enzym: dialysierte Rohextrakte. *) Ammonsulfatfraktion.

So dachten wir an die naheliegende Möglichkeit einer Dephosphorylierung von FDP zu F-6-P mit anschließender Spaltung zu Azetyl-P und Tetrose-P durch die F-6-P-Phosphoketolase. Dieses Tetrose-P sollte dann zusammen mit entstandenem F-6-P im Bifidoshunt zu weiteren Intermediärprodukten also auch Triose-P umgewandelt werden können. Bei den folgenden Versuchen wollten wir daher sowohl die Bildung von Triose-P als auch die von Azetyl-P aus FDP nachweisen. In Parallelversuchen setzten wir außerdem F-6-P und F-1-P als Substrate ein. Als Enzym verwendeten wir einen dialysierten Rohextrakt von *B. pseudolongum* PNC-2-96, ein Stamm, der nach Scardovi et al. (1960) zu den Aldolase-positiven Stämmen zählt (vgl. Abb. 28).

Zunächst prüften wir die Bildung von Azetyl-P, das als Aceto-Hydroxamsäure gemessen wurde (Lipmann und Tuttle, 1945).

Da zur Spaltung von F-6-P durch F-6-P-Phosphoketolase Phosphat notwendig ist (Scardovi et al., 1969), wurden Proben mit und ohne Phosphat angesetzt. Als Kontrolle dienten Proben ohne Substrat.

Wie die Abb. 29 zeigt, wird aus FDP zunächst verzögert, dann aber in einem linearen Umsatz, Azetyl-P gebildet. Die Gegenwart von Phosphat ist nicht erforderlich, ja eher sogar hinderlich, da der Umsatz mit Phosphat im Vergleich zu dem ohne Phosphat um etwa 30 % vermindert ist. Demgegenüber wird der Umsatz von F-6-P durch Phosphat kräftig stimuliert. F-1-P wird in keinem Fall umgesetzt.

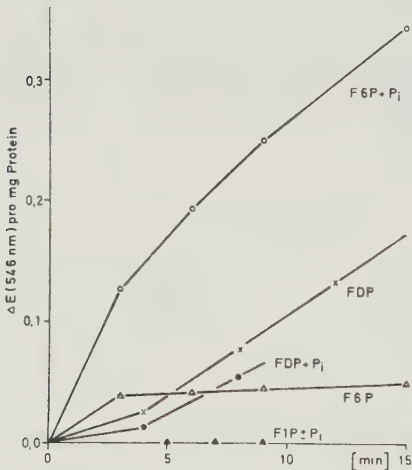


Abb.29:

Vergleich der Bildung von Azetyl-P aus F-1-P, F-6-P und FDP mit und ohne Phosphat im Testgemisch. Enzym: dialysierter Rohextrakt von *B.pseudolongum* PNC-2-9G. 1 μ M Azetyl-P entspricht einem $\Delta E(546 \text{ nm})$ von 0,05. P_i = Phosphat.

Der Befund, daß Azetylphosphat aus FDP trotz unterlassener Phosphatzugabe gebildet werden kann, weist darauf hin, daß die Phosphatgruppe am C-1 von FDP nach Abspaltung durch die Phosphatase frei wird und als Akzeptor des "aktiven" Glycolaldehyds bei der F-6-P-Phosphoketolasereaktion genutzt werden kann. Andererseits wirkt sich die Zugabe von Phosphat hinderlich aus, was nicht leicht zu deuten ist. Es besteht aber die

Möglichkeit, daß die Phosphatase in Gegenwart größerer Mengen an Phosphat gehemmt wird.

Als nächstes bestimmten wir die spezifische Aktivität der Bildung von Triose-P und Azetyl-P in Abhängigkeit von den Cofaktoren Thiamin-PP, Mg^{++} und Phosphat, die zur Aktivierung der F-6-P-Phosphoketolase notwendig sind (Scardovi, 1964; Schramm et al., 1958). Als Substrat setzten wir wieder F-1-P, F-6-P oder FDP ein. Die Bildung von Triose-P wurde mit dem modifizierten Aldolase-UV-Test (Boehringer-Testkombination) bei 366 nm gemessen, wobei statt Collidin-puffer Trispuffer eingesetzt wurde. Die NADH-Oxidase-Aktivität wurde berücksichtigt.

Die Bildung von Azetyl-P wurde auf zwei verschiedene Arten gemessen. Einerseits benutzten wir hierzu den Farbstest (546 nm) nach Lipmann und Tuttle (1945), andererseits die bei 405 nm meßbare Reduktion von Hexacyano-ferrat-(III) $K_3Fe(CN)_6$, bei der der "aktive", Thiamin-PP-gebundene Glycolaldehyd oxidiert wird (Goldberg und Racker, 1962).

Wie die Tab.11 zeigt, wird erwartungsgemäß sowohl die Bildung von Triose-P als auch die von Azetyl-P nach Zugabe von Thiamin-PP und Mg^{++} gesteigert. Sogar bei F-1-P als Substrat wurde sehr schwache Triose-P-Bildung beobachtet. Wird außer Thiamin-PP und Mg^{++} auch noch Phosphat zugesetzt, so wird bei F-6-P die Bildung von Triose-P verdoppelt, während die von Azetyl-P noch drastischer gesteigert wird; bei FDP als Substrat wird nach Zugabe von Phosphat sowohl die Bildung von Triose-P als auch die von Azetyl-P (vgl. Abb.29) etwas erniedrigt; bei F-1-P wird ebenfalls die Triose-P-Bildung nach Zugabe von Phosphat vermindert, während in keinem Fall Bildung von Azetyl-P aus F-1-P nachgewiesen werden konnte.

Die beim Aldolase-Farbstest (Substrat: FDP) ermittelte spezifische Aktivität (20,8 U/mg) stimmt mit der beim letzten Ver-

such errechneten (Bildung von Triose-P ohne Thiamin-PP und Mg^{++} : 19 U/mg) praktisch überein.

Die Versuche zeigen also, daß die bei den Aldolase-Tests ermittelten Aktivitäten nicht auf das Enzym Aldolase, sondern wahrscheinlich auf ein Zusammenwirken der Enzyme Phosphatase, F-6-P-Phosphoketolase, Transaldolase, Transketolase und Pentose-P-Phosphoketolase zurückzuführen sind.

Tab.11: Die spezifische Aktivität der enzymatisch katalysierten Umsätze von F-1-P, F-6-P und FDP zu Triose-P und Azetyl-P in Abhängigkeit von Thiamin-PP, Mg^{++} und Phosphat.

Enzym: dialysierter Rohextrakt von *B.pseudolongum* PNC-2-9G. Messung von Triose-P bei 366 nm, Azetyl-P bei 546 nm (Lipmann und Tuttle, 1945), außerdem bei 405 nm (Hexacyanoferrat-(III)-Methode bei 37°C.

Substrat	Cosubstrat ^{*)}	Spezifische Aktivität (mU/mg) bezüglich der Bildung von		
		Triose-P (366 nm)	Azetyl-P (546 nm)	(405 nm)
F-6-P	nicht zugegeben	25	n.b.	82
	TPP, Mg^{++} ,	50	20	109
	TPP, Mg^{++} , P_i	100	440	--
FDP	nicht zugegeben	19	n.b.	12
	TPP, Mg^{++}	40	255	21
	TPP, Mg^{++} , P_i	35	210	--
F-1-P	nicht zugegeben	0	n.b.	0
	TPP, Mg^{++}	22	0	0
	TPP, Mg^{++} , P_i	13	0	--

^{*)} TPP = Thiaminpyrophosphat, P_i = Orthophosphat.

2.3. Hexosemonophosphat-Dehydrogenasen.

In der Literatur ist man allgemein der Ansicht, daß der HMP-Weg der Glukose-Dissimilation bei Bifidobakterien keine Bedeutung hat. Von den HMP-Dehydrogenasen wurde bisher nur 6-P-Glukonat-DH bei allen Arten nachgewiesen (Scardovi et al., 1969 bis 1974). Die Glukose-6-P-DH kommt dagegen bei Bifidobakterien aus dem Darm des Menschen nicht vor (de Vries und Stouthamer, 1967), sondern nur bei Arten aus dem Intestinaltrakt von Tieren.

Über die spezifische Aktivität der beiden Enzyme wurden allerdings nur vage Angaben gemacht. Ferner blieb unklar, ob das Vorkommen von Glukose-6-P-DH zur Artdifferenzierung beiträgt. Wir bestimmten daher die spezifische Aktivität der beiden Dehydrogenasen und außerdem deren Cofaktor-Spezifität bei verschiedenen Bifidobakterien. Um methodische Mängel auszuschließen, bezogen wir auch *L. fermentum* und *L. bulgaricus* als positive bzw. negative Kontrolle bei den Untersuchungen mit ein. Bekanntlich besitzt *L. fermentum* die HMP-Dehydrogenasen, *L. bulgaricus* aber nicht.

Wie die Tabelle 12 zeigt, ist bei keinem Stamm eine mit *L. fermentum* vergleichbare Glukose-6-P-Dehydrogenase-Aktivität vorhanden. Da sich die Umsätze am Rand des Meßbaren bewegten, war die Beurteilung des Umsatzes häufig schwierig. Es ist daher problematisch, die Bifidobakterien anhand dieser schwach positiven oder negativen Reaktionen unterscheiden zu wollen. Immerhin kann man vielleicht sagen, daß Stämme aus tierischen Biotopen im Gegensatz zu denen aus dem Darm des Menschen schwache Aktivität besitzen. Die Cofaktor-Spezifität ist bei den Stämmen unterschiedlich.

Im Gegensatz zur Glukose-6-P-Dehydrogenase fanden wir bei allen Stämmen eine NADP-abhängige 6-P-Glukonat-Dehydrogenase.

Tab.12: Spezifische Aktivität und Cofaktor-Spezifität der Glukose-6-P- und 6-P-Glukonat-Dehydrogenase in zellfreien Extrakten von Bifidobakterien und Lactobazillen.

*) Ammonsulfatfraktion (40-70 %).

Stamm	Spezifische Aktivität (mU/mg)			
	Glukose-6-P-DH		6-P-Glukonat-DH	
	NAD	NADP	NAD	NADP
L.fermentum 15/7	200	200	25	175
L.bulgaricus 3a	0	0	0	0
B.adolescentis ATCC 15703	0	0	0	4
B.adolescentis RU 424	0	0	0	3
A.eriksonii ATCC 15423	0	0	0	45
B.indicum C 410	n.b.	n.b.	n.b.	120
B.asteroides C 51	15	0	0	150
B.animalis R 101-8	15	0	0	50
B.longum E 194 b	0	0	0	35
B.longum W 1 *)	0	0	0	65
A.parabifidus ATCC 17930	0	0	0	15
B.pseudolongum PNC-2-9G	6	0	0	30
B.globosum RU 224	20	0	0	60
B.thermophilum P 2-91 *)	0	10	0	75
B.ruminale RU 326	0	4	0	130

2.4. Fruktose-6-P-Phosphoketolase.

Die Existenz der F-6-P-Phosphoketolase bei Bifidobakterien ist hinreichend bekannt und bei allen Arten untersucht worden (Scardovi, 1964; Scardovi et al., 1965 bis 1974; de Vries et al., 1967; de Vries und Stouthamer, 1967; Veerkamp, 1969).

Wir untersuchten daher nur zwei Stämme, nämlich A.eriksonii ATCC 15423 und A. parabifidus ATCC 17930, deren Zugehörigkeit zur Gattung Bifidobakterium bisher zweifelhaft geblieben war. Nur zur Kontrolle unserer Methodik prüften wir noch weitere

Bifidobakterien, die das Enzym laut Literatur besitzen (Scardovi und Trovatelli, 1969; 1974; de Vries und Stouthamer, 1967). Als negative Kontrolle dienten Extrakte von *L.bulgaricus*, *L.casei*, *L.curvatus*, *St. epidermidis* und *Peptococcus prevotii*.

Zum Nachweis des Enzyms prüften wir die Bildung von Azetyl-P aus Fruktose-6-P. Azetyl-P wurde als Azetohydroxamat nach Lipmann und Tuttle (1945) bestimmt.

Wie die Tab. 13 zeigt, ist die Aktivität der F-6-P-Phosphoketolase bei *A. eriksonii* und bei *A. parabifidus* durchaus mit der der Bifidobakterien zu vergleichen. Bei sämtlichen getesteten Lactobazillen, bei *St. epidermidis* und bei *Peptococcus prevotii* ist dagegen keine Aktivität vorhanden.

Im Gegensatz zu unserem Ergebnis konnten Scardovi und Trovatelli (1965) bei *A. eriksonii* keine Aktivität finden.

Tab. 13: Die spezifische Aktivität der Fruktose-6-P-Phosphoketolase im zellfreien Extrakt von *A. eriksonii*, *A. parabifidus* und verschiedenen Bifidobakterien.

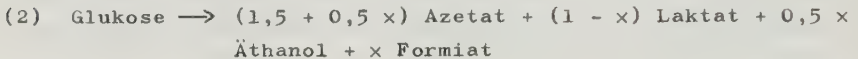
Stamm	F-6-P-Phosphoketolase U/mg
<i>B.longum</i> E 194 b	0,43
<i>B.adolescentis</i> ATCC 15703	1,35
<i>B.animalis</i> R 101-8	0,68
<i>A.eriksonii</i> ATCC 15423	0,89
<i>A.parabifidus</i> ATCC 17930	1,40

3. Versuche zum Mechanismus der Variation der Gärungsprodukte.

Untersuchungen von Scardovi (1964) und de Vries et al. (1967) hatten gezeigt, daß Bifidobakterien Glukose zu Azetat und L-Laktat im Verhältnis 3:2 vergären (1).



In vielen Fällen zeigte es sich jedoch, daß das Verhältnis Azetat zu Laktat größer als 3:2 ist. De Vries und Stouthamer (1968) stellten fest, daß in solchen Fällen neben Azetat und Laktat auch beträchtliche Mengen an Formiat und Äthanol gebildet werden. Sie nahmen an, daß ein Teil des intermediär entstehenden Pyruvats nicht zu Laktat reduziert, sondern phosphoroklastisch zu Formiat und Azetat gespalten wird. Damit ist die Redoxbilanz nicht ausgeglichen und es muß daher gemäß (2) ein Teil des Azetats zu Äthanol reduziert werden.



($\times$ = die pro Mol Glukose gebildeten Mole Formiat).

Wir bemühten uns einerseits den von de Vries und Stouthamer postulierten Mechanismus endgültig zu beweisen, andererseits prüften wir, ob dieser Mechanismus ein artspezifisches und damit taxonomisch verwertbares Merkmal darstellt.

3.1. Das Verhältnis Azetat zu Laktat während des Wachstums verschiedener Stämme.

Zur Erreichung des ersten Ziels wählten wir *B. adolescentis* ATCC 15703 und *B. pseudolongum* PNC-2-9G aus, die in Medium III Azetat und L-Laktat in recht unterschiedlichem Verhältnis bilden (Abb. 30 und 31). Während *B. adolescentis* Azetat und Laktat stets im Verhältnis 3:2 bildet, setzt die Laktatbildung bei *B. pseudolongum* erst kurz vor Erreichen der stationären Phase (etwa ab pH 6) ein.

Erntete man Zellen von *B. adolescentis* aus frühstationärer oder logarithmischer Phase und ließ sie in Phosphatpuffer bei pH 6,5 oder 5,4 weiter gären, wobei der pH-Wert durch Zugabe von NaOH zunächst 2 bis 2,5 Stunden lang konstant gehalten wurde, so ergab sich ebenfalls ein Quotient Azetat/Laktat von 1,5 (Tab.14).

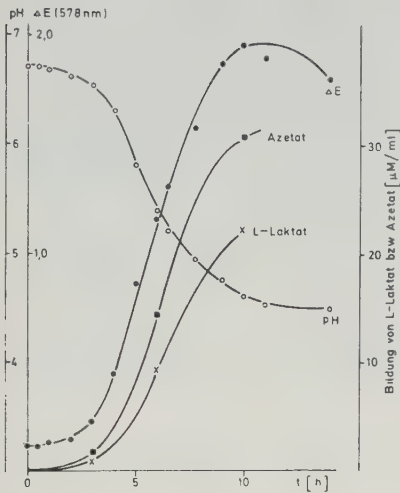


Abb.30:

Wachstum und Gärung von *B. adolescentis* ATCC 15703 in Medium III mit 1 % Glukose.

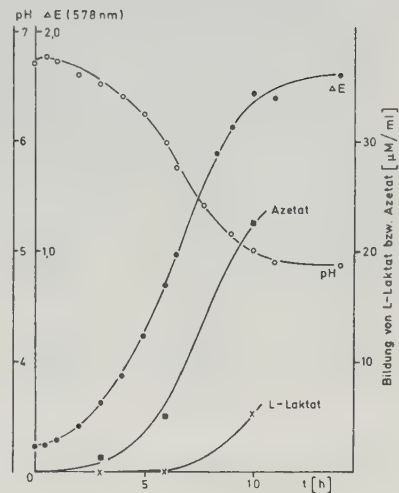


Abb.31:

Wachstum und Gärung von *B. pseudolongum* FNC-2-9G in Medium III mit 1 % Glukose.

B. pseudolongum hatte dagegen (Tab.14) nach 6 Stunden Wachstum zwar reichlich Azetat ($7,4 \mu\text{M/ml}$), aber praktisch noch kein Laktat gebildet. Erst in der darauffolgenden Stunde setzte die Laktatbildung ein. Aus der Zunahme der beiden Säuren in dieser zeitspanne ergab sich ein Quotient von 2,7. Die Zellen, die sich nun am Ende der logarithmischen Phase befanden, wurden geerntet und bildeten bei der anschließenden Gärung in Phosphatpuffer bei konstant gehaltenem pH von 6,5 Azetat und Laktat im Verhältnis von etwa 2:1. Als die Titration der entstehenden Säuren nach 2,5 Stunden eingestellt worden war, sank der pH-Wert rasch auf pH 4,82 ab. Dabei wurde Azetat und Laktat in einem noch kleineren Verhältnis (1,7 : 1) als vorher gebildet.

Tab.14: Vergärung von Glukose in Medium III und in Puffer.

Puffer: 50 ml 0,1 M Phosphatpuffer pH 6,5 oder 5,4 mit 2 % Glukose, 1 % Ascorbat und 0,05 % Cystein.

Zellen: Die Ernte der Zellen aus dem Medium erfolgte nach der in der Tabelle angegebenen Zeit. (Weiteres in Material und Methoden)

Stamm (Entnahme)	Gärung der Zellen im	Zeit (Stdh)	pH	Azetat Laktat (μ M/ml)		Azetat Laktat	Δ Azetat Δ Laktat
<u>B.adolescentis</u> (stationäre Phase)	Medium	13,5	4,51	40,7	30,6	1,3	-
		15,5	4,36	50,0	34,2	1,5	2,6
	Puffer pH 6,5	2,3	6,48	49,2	36,4	1,4	-
		19,3	4,92	115	74,7	1,5	1,7
(Ende der logarithmi- schen Phase)	Medium	5,0	5,43	11,0	8,1	1,4	-
		6,0	5,13	15,8	11,6	1,4	1,4
	Puffer pH 6,5	0,7	6,45	7,6	5,5	1,4	-
		2,0	6,48	24,6	15,3	1,6	1,7
		15,0	4,84	84,0	42,7	2,0	2,2
(Ende der logarithmi- schen Phase)	Medium	6,0	5,83	5,5	3,4	1,6	-
		8,0	5,05	11,1	7,6	1,5	1,3
	Puffer pH 5,4	0,5	5,25	4,0	3,3	1,2	-
		2,5	5,35	19,3	12,8	1,5	1,6
		14,0	4,38	63,7	39,0	1,6	1,7
<u>B.pseudolongum</u> (Ende der logarithmi- schen Phase)	Medium	6,0	5,71	7,4	0,5	14,8	-
		7,0	5,38	9,8	1,4	7,0	2,7
	Puffer pH 6,5	1,0	6,48	8,6	4,3	2,0	-
		2,5	6,48	23,2	11,2	2,1	2,1
		16,0	4,82	71,2	39,8	1,8	1,7
(Ende der logarithmi- schen Phase)	Medium	5,6	5,41	9,6	1,04	9,2	-
		6,0	5,35	10,6	1,45	7,3	2,5
	Puffer pH 5,4	1,0	5,33	6,2	4,6	1,3	-
		2,5	5,38	16,6	12,4	1,3	1,3
		15,5	4,43	53,8	38,2	1,4	1,4

Zellen entsprechender Ernte ließen wir auch bei pH 5,4 in Puffer Glukose vergären (Tab.14). Dabei ergab sich ein Quotient Azetat/Laktat von nur 1,4. Eine Berechnung der bei pH 5,4 vergorenen Absolutmengen an Glukose ergab einen um 15 % geringeren Glukoseverbrauch als für pH 6,5, obwohl im ersteren Fall die optische Dichte der Zellsuspension um 10 % höher war, also ein höherer Glukoseverbrauch zu erwarten gewesen wäre. Demnach ist die Aktivität der Zellen bei pH 5,4 um rund 25 % niedriger. Diese Hemmung der Gärung betrifft vorwiegend die Azetatbildung, so daß das Verhältnis Azetat zu Laktat fast genau dem theoretischen Verhältnis (3:2) der Gleichung (1) entspricht. In diesem Fall wird also das intermediär entstandene Pyruvat nur noch zu Laktat reduziert und nicht teilweise phosphoroklastisch abgebaut.

3.2. Die C¹⁴-Verteilung auf die Gärungsprodukte nach Kultivierung mit verschiedenen positionsmarkierter Glukose.

Zur direkten Prüfung der Frage, ob im Fall von *B.pseudolongum* eine phosphoroklastische Spaltung intermediär entstehenden Pyruvats stattfindet, ließen wir diesen Stamm in Medium III mit C¹⁴-positionsmarkierter Glukose (0,3 %) wachsen. Die Art und Position der Markierung geht aus Tab. 15 hervor. Als Inokulum diente eine frisch bereitete Suspension spät-logarithmischer Zellen. Es wurde mit einem Fünftel der in spät-logarithmischer Phase zu erwartenden Zelldichte angeimpft und unter anaeroben Bedingungen bei 37° inkubiert. In einer mitgeführten Kontrolle wurde der Glukoseverbrauch enzymatisch bestimmt. War die Glukose verbraucht, so wurde der Versuch beendet, und die Produkte isoliert und enzymatisch bestimmt.

Der obere Teil der Tab. 15 zeigt den tatsächlich vergorenen Anteil der Glukose. Er ergibt sich nach Abzug der in den Zellen und im Rückstand nach Ätherextraktion gemessenen Radioaktivität von der insgesamt eingesetzten Markierung (ca. 3×10^6 Ipm). Der nicht Äther-extrahierbare, radioaktive Anteil des Rückstandes ist vermutlich auf Kapselschleime und unvergorene Glukose zurückzuführen.

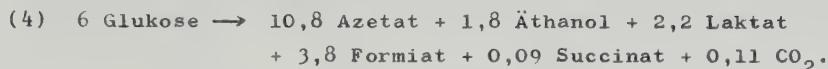
Tab.15: Prozentuale Verteilung von C^{14} auf die Gärungsprodukte von *B.pseudolongum* PNC-2-9G nach Kultivierung in Medium III mit 0,3 % Glukose- C^{14} .

	Glukose-				
	u- C^{14}	1- C^{14}	3- C^{14}	3,4- C^{14}	6- C^{14}
Zellen	3,2	4,1	6,7	7,2	8,4
Rückstand nach Ätherextraktion	14,9	3,5	9,9	7,7	7,3
vergorene Glukose	81,9	92,4	83,4	85,1	84,3
Gärungsprodukte (vergorene Glukose = 100)					
CO ₂	0,3	-	-	-	-
Formiat	10,6	0,6	0,3	40,2	0,8
Äthanol	9,8	9,1	13,1	3,4	14,8
Azetat	60,0	87,7	84,8	45,6	65,7
L-Laktat	18,3	2,0	1,8	10,2	18,1
Succinat	1,0	0,3	0	0,5	0,6

Der untere Teil der Tabelle gibt die C^{14} -Verteilung auf die Produkte wieder. Die erste Spalte, die die Ergebnisse bei Vergärung uniform markierter Glukose enthält, erlaubt eine Übersicht des Verhältnisses der Produkte zueinander und ermöglicht die Formulierung der Gärungsgleichung (3):

$$\begin{aligned}
 (3) \quad 100 \text{ Glukose} &\longrightarrow (3 \times 60,0) \text{ Azetat} + (3 \times 9,8) \text{ Äthanol} + \\
 &\quad (2 \times 18,3) \text{ L-Laktat} + (6 \times 10,6) \text{ Formiat} + \\
 &\quad (1,5 \times 1) \text{ Succinat} + (6 \times 0,3) \text{ CO}_2 \\
 &\longrightarrow 180 \text{ Azetat} + 29,4 \text{ Äthanol} + 36,6 \text{ Laktat} \\
 &\quad + 63,6 \text{ Formiat} + 1,5 \text{ Succinat} + 1,8 \text{ CO}_2
 \end{aligned}$$

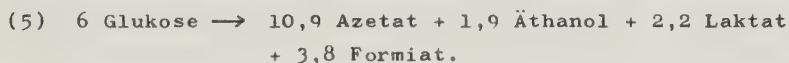
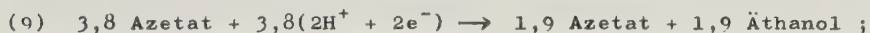
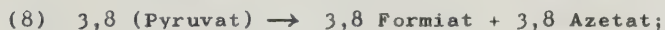
oder vereinfacht:



Setzt man nun die experimentell ermittelten Mole Formiat für x in Gleichung (2) ein und vernachlässigt die geringen Mengen an Succinat und CO₂, so erhält man eine numerisch gut mit (4) übereinstimmende Gleichung (5).



Daher müssen Gleichung (4) und (5) unter Zugrundelegung der phosphoroklastischen Spaltung auf folgender Reaktionsfolge beruhen :



Die Richtigkeit dieser Annahme beweisen auch die Daten der C¹⁴-Verteilung bei Vergärung positionsmarkierter Glukose (Tab.15).

Formiat entsteht nur aus C-4 der Glukose, und Laktat nur aus C-4,5,6. Die geringe Markierung von Laktat bei Vergärung von Glukose-1-C¹⁴ und -3-C¹⁴ kommt vermutlich dadurch zustande, daß eine geringfügige Umgruppierung der C-Atome der Hexose auf dem Niveau der Zuckerphosphate erfolgt und daher die Isotopenverteilung in dem zur Spaltung gelangenden Fruktose-6-Phosphat nicht mehr vollständig mit der in der zugesetzten Glukose identisch ist. Solche Umgruppierungen konnte kürzlich Stackebrandt (1974) im Rahmen von gärungsphysiologischen Untersuchungen an Cellulomonas in besonders starkem Ausmaß zeigen.

Besonders beweisend für die Beteiligung der phosphoroklastischen Spaltung ist die Entstehung von Azetat und Äthanol aus C-6 (damit folglich auch aus C-5).

Die Daten in Tab.15 zeigen ferner, daß sowohl das aus C-1 (und damit folglich auch das aus C-2) und C-3 als auch das aus C-6 (und C-5) entstandene Azetat gleichermaßen zu Äthanol reduziert werden kann, d.h. daß das aus der ketolasespaltung und das aus der phosphoroklastischen Spaltung entstandene Azetat gleich gut für die enzymatische Reduktion verfügbar ist. Es liegt also keine Kompartimentierung bzw. keine an einen Multienzymkomplex gebundene Reduktion des aus Pyruvat entstandenen Azetats vor.

3.3. Die Artspezifität des Quotienten Azetat/Laktat.

Aus Abb.30 und 31 war zu ersehen, daß bei *B.pseudolongum* im Gegensatz zu *B.adolescentis* das Verhältnis Azetat zu Laktat erheblich vom Entwicklungszustand abhängt. Während in der frühstationären Phase praktisch nur Azetat und kein Laktat entsteht, wird letzteres erst gegen Ende der logarithmischen Phase gebildet. Dadurch verkleinert sich der Quotient Azetat/Laktat schnell und erreicht schließlich in der stationären Phase beinahe den gleichen Wert wie bei *B.adolescentis*. Da es sich bei den beiden genannten Stämmen um verschiedene Arten handelt, war zu klären, ob die erhebliche Beteiligung des phosphoroklastischen Abbauweges ein artspezifisches Merkmal darstellt. Hierzu mußte eine größere Anzahl von Vertretern jeder Art untersucht werden. Daher suchten wir nach einem einfacheren Testverfahren als die bisher angewandte, laufende Säuremessung während des Wachstums. Dabei gingen wir von der Beobachtung aus, daß die größten Abweichungen im Azetat/Laktat-Verhältnis in der logarithmischen Phase auftreten, während in der stationären Phase eine starke Angleichung erfolgt. Die Entwicklung der zu untersuchenden Stämme sollte also nur auf die logarithmische Phase beschränkt

bleiben und danach schnell zum Stillstand kommen. Das wird am einfachsten dadurch erreicht, daß man nur eine geringe, wachstumsbegrenzende Menge an Glukose zum Medium gibt. Zunächst ließen wir daher *B.pseudolongum* und *B.adolescentis* mit wachstumsbegrenzender Glukosemenge wachsen und bestimmten am Ende das Verhältnis Azetat zu Laktat. Das Ergebnis zeigt die Tab. 16. Sie enthält auch die Werte der Kontrolle ohne und mit einem Überschuß an Glukose. Die in der Kontrolle ohne Glukose aus endogenem Material gebildeten bzw. schon zu Beginn im Medium enthaltenen Produktmengen wurden bei den Werten für die Proben mit Glukose abgezogen.

Tab.16: Vergärung von wachstumsbegrenzenden und nicht wachstumsbegrenzenden Glukosekonzentrationen in Medium III durch *B.pseudolongum* PNC-2-9G und *B.adolescentis* ATCC 15703.

Stamm	Glukose im Medium $\mu\text{M/ml}$	Rest- Glukose $\mu\text{M/ml}$	Produkte		Quotient Azetat/ Laktat
			Azetat $\mu\text{M/ml}$	Laktat $\mu\text{M/ml}$	
<i>B.pseudolongum</i>	0	0	4,8	0,6	-
	15	0,4	17,3	3,5	4,9
	25	0,4	26,2	6,2	4,2
	35	6	35,0	14,9	2,4
	100	>10	34,0	15,1	2,3
<i>B.adolescentis</i>	0	0	1,2	0,2	-
	25	0,2	28,1	14,8	1,9
	35	0,2	47,7	26,9	1,8
	100	>10	52,5	30,9	1,7

Tatsächlich ergab sich bei *B.pseudolongum* bei wachstumsbegrenzender Menge an Glukose (15 oder 25 $\mu\text{M/ml}$) ein Quotient Azetat/Laktat von $\frac{1}{4}$, dagegen von nur etwa 2 bei ausreichender Glukosemenge im Medium. Bei *B.adolescentis* ist nur ein geringer Ein-

fluß der verschiedenen Glukosemengen festzustellen. Der Quotient ist hier in allen Fällen kleiner als 2.

In Parallelproben (nicht angegeben) setzten wir während der logarithmischen Phase (nach 6 Stunden) 1 % Pyruvat zu den Kulturen hinzu. Wir hofften, daß im Falle von *B.pseudolongum* eine phosphoroklastische Spaltung des Pyruvats zu Azetat und Formiat eintreten und zu einem besonders hohen Quotienten Azetat/Laktat führen würde. Entgegen unseren Erwartungen ergab sich ein Wert von nur 2,7, da nämlich zugesetztes Pyruvat zu Laktat reduziert wurde und einen leichteren Ausgleich der Redoxbilanz ermöglichte. Bei *B.adolescentis* konnte kein besonderer Einfluß des Pyruvats festgestellt werden.

Nachdem wir nachgewiesen hatten (Tab.16), daß unter wachstumsbegrenzenden Mengen an Glukose (25 μ M/ml) je nach Stamm unterschiedliche Quotienten Azetat/Laktat deutlich in Erscheinung treten, kultivierten wir auch alle weiteren Stämme nicht nur mit 2 % sondern auch mit 0,5 % Glukose und bestimmten jeweils den nach 24 Stunden erreichten Quotienten Azetat/Laktat. Die Ergebnisse in Tab. 17 lassen erkennen, daß der Wert des Quotienten mehr ein stammspezifisches als ein artspezifisches Merkmal darstellt und daher nicht zur Artdifferenzierung benutzt werden kann.

So hat zum Beispiel der Quotient bei der Hälfte der zu *B.adolescentis* zählenden Stämme den Wert von etwa 1,5, während bei den übrigen Stämmen beträchtlich höher liegende Werte gefunden wurden. Der auf Reuter zurückgehende Stamm *B.adolescentis* c erreichte hierbei ein auffallend hohes Verhältnis von fast 17:1, da die Laktatbildung nahezu völlig fehlte. Bereits de Vries und Stouthamer (1968) wiesen auf dieses ungewöhnliche Verhalten bei einem ihrer untersuchten Stämme^{*} hin.

* S 327 = *B.bifidum* B 420 (Beerens)

Tab.17: Das Verhältnis Azetat zu Laktat bei verschiedenen Stämmen nach Kultivierung mit das Wachstum begrenzender und nicht begrenzender Glukose.

Stamm	Glukosekonzentration im Medium:					
	0,5 % (25 µM/ml)			2,0 % (100 µM/ml)		
	Produkt (µM/ml)		Azetat Laktat	Produkt (µM/ml)		Azetat Laktat
	Azetat	Laktat		Azetat	Laktat	
<u>B.bifidum</u>						
E 319 f	8,28	1,00	8,3	11,9	1,2	10,0
H1 3	17,1	2,7	6,4	17,7	2,6	6,8
Sl 1a	17,5	5,2	3,4	23,4	7,0	3,3
<u>B.longum</u>						
E 194 b	41,3	15,0	2,8	42,2	32,7	1,3
ATCC 17 930	21,4	10,4	2,1	30,3	22,8	1,3
W 1	34,8	12,1	2,9	35,8	24,7	1,5
W 2	41,5	14,5	2,9	40,0	21,5	1,8
W 5	35,3	10,0	3,5	49,0	12,5	3,9
Bs 9 M	37,2	21,7	1,7	30,8	24,7	1,3
F 2 M	31,5	14,9	2,1	40,3	24,0	1,7
<u>B.adolescentis</u>						
ATCC 15 703	28,1	14,8	1,9	52,5	30,9	1,7
ATCC 15 423	9,5	6,1	1,6	17,8	9,1	2,0
RU 424	22,3	14,7	1,5	25,3	22,7	1,1
Ms 1	17,1	5,1	3,4	18,6	7,8	2,4
St 1	18,2	14,3	1,3	24,3	17,0	1,4
Fl	29,2	15,4	1,9	40,7	28,9	1,4
St 5	40,7	12,2	3,3	44,0	24,8	1,8
St 1 M	31,5	13,7	2,3	59,0	21,7	2,7
St 7	43,3	13,2	3,3	46,3	30,0	1,5
c	20,0	1,2	16,8	24,2	1,6	15,1
<u>B.pseudolongum</u>						
PNC-2-9G	26,2	6,2	4,2	34,0	15,1	2,3
RU 224	14,5	10,1	1,4	37,2	21,4	1,7
Mo 2-10	6,4	0,7	8,8	8,0	1,0	8,1
<u>B.thermophilum</u>						
P 2-91	22,7	17,1	1,3	33,7	22,2	1,5
14 -44	20,9	18,1	1,2	39,2	17,1	2,3
P 16-6	45,5	12,7	3,6	43,6	33,8	1,3
Nissin	23,4	18,5	1,3	36,3	24,7	1,5
C 3/12	21,4	15,7	1,4	28,0	26,6	1,1
<u>B.animalis</u>						
R 101-8	20,3	7,6	2,7	26,8	14,3	1,9
P 23	24,7	8,5	2,9	22,6	12,2	1,9
F 437	41,0	2,7	15,0	27,1	9,1	3,0

4. Untersuchung des Spektrums vergärbarer Kohlenhydrate.

Seit jeher diente die Vergärbarkeit verschiedener Kohlenhydrate als klassische Grundlage zur Unterscheidung von Milchsäurebakterien. Besondere Bedeutung kommt hierbei den Pentosen L-Arabinose und D-Xylose zu, deren Verwertbarkeit vom Besitz mehrerer zusätzlicher Enzyme abhängt, wohingegen Oligosaccharide schon durch eine einzige Hydrolase in vergärbare Zucker gespalten werden können.

Reuter (1964) schlug als erster ein Klassifikationssystem dieser Art bei Bifidobakterien aus dem Menschendarm vor. Mitsuoka (1969) bezog neue Typen aus tierischen Biotopen mit ein. Zum Vergleich prüften auch wir Eigenisolate aus dem Menschendarm und einige der Stämme von Mitsuoka. Die Ergebnisse in Tab. 18 stimmen mit Mitsuoka gut überein. Die Angabe des Mureintyps der Stämme als weiteres Merkmal stützt im Großen und Ganzen die nach Mitsuokas System vorgenommene Unterscheidung von Arten.

Eine Übersicht über die von den Spezies vergorenen, wichtigsten Kohlenhydrate gibt die Tab.19.

Unter Einbeziehung der Ergebnisse anderer Autoren kann allgemein herausgestellt werden :

Glukose, Galaktose und Fruktose werden von allen Stämmen gut vergoren, meistens auch Saccharose, Maltose, Melibiose und Raffinose, wobei jedoch *B. bifidum* und Keime der Gruppe "minimum" (Scardovi und Trovatelli, 1974) nur schwach positiv oder sogar negativ sind. Von der Gruppe "minimum" wird allerdings auch Galaktose nicht verwertet (Scardovi und Trovatelli, 1974).

Rhamnose, Sorbose, Glyzerin oder Ascorbat werden von keiner Art vergoren.

Aufgrund der Verwertbarkeit der Pentosen L-Arabinose, D-Xylose und D-Ribose lassen sich 4 Gruppen unterscheiden :

Gruppe 1: Pentose-Vergärung negativ.

Gruppe 2: Ribose-Vergärung positiv (Arabinose und Xylose negativ).

Gruppe 3: Xylose- und Ribose-Vergärung positiv (Arabinose negativ).

Gruppe 4: Pentose-Vergärung positiv.

Gruppe 1 umfaßt die Arten *B.bifidum*, *B.thermophilum* (Syn. *B.ruminale*) sowie den Stamm F 392 ("minimum").

Gruppe 2 enthält die Arten *B.infantis*, *B.breve*, *B.liberorum* und *B.parvulorum*, wobei allerdings *B.liberorum* nach der Literatur Xylose verwerten sollte, bei uns jedoch eindeutig negativ war. Der Stamm F 395 ("subtile") konnte zwar bei uns Xylose langsam verwerten, ist aber bei Scardovi und Trovatelli (1974) negativ und wird daher ebenso zu dieser Gruppe gestellt.

Zur Gruppe 3 zählen nur *Actinomyces parabifidus* ATCC 17930 und *B.lactentis* 659. Letzterer Stamm konnte jedoch Ribose weder bei uns noch bei Mitsuoka (pers.Mitt., 1972) verwerten. Dieser hatte früher (Mitsuoka, 1969) allerdings eine verzögerte Vergärung von Ribose angegeben.

In die Gruppe 4 gehören die meisten der von uns untersuchten Arten und Stämme. Die Einordnung von Stämmen der Art *B. animalis* ist etwas problematisch, da einige Stämme, wie bei uns z.B. der Stamm P 23, keine Arabinose verwerten, während bei Scardovi und Trovatelli (1974) alle Stämme positiv waren (vgl.hierzu S.25 bei Scardovi und Trovatelli, 1974).

Innerhalb der Gruppe 4 besitzen 2 Arten, *B.indicum* und *B.coryneforme*, die zusätzliche, innerhalb der Gattung einzigartige Fähigkeit, auch D-Arabinose vergären zu können. Leider standen uns nur jeweils ein Stamm zur Verfügung, so daß wir dieses Merkmal vorerst nicht verallgemeinern können.

Tab.18: Spektrum vergärbarer Kohlenhydrate. Mureintyp und Differenzierungsergebnis bei verschiedenen Stämmen. (+ = vergärbar, - = nicht vergärbar, o = nicht untersucht)

Stamm	Vergärbarkeit von										Mureintyp	Differenzierungs- ergebnis							
	L-Arabinose	Xylose	Ribose	Mannose	Laktose	Saccharose	Maltose	Cellobiose	Trehalose	Melezitose			Raffinose	Sorbit	Salicin	Aesculin	Glykogen	Inulin	Stärke
S11a,H13	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	OrnSerAsp B.bifidum
P2-91, Nissin,C3/12	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	(+)	-	+	(+)	+	-	LysGlu B.thermophilum
S13,S16,S17 S12,S14	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	LysGly LysGly B.parvulorum B.breve
Bs6M,F2M,F3 BsQM w1	+	+	(+)	(+)	+	+	+	-	o	+	+	-	-	-	-	(+)	-	-	OrnSerAla- ThrAla B.longum
R101-8	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	(+)	-	-	-	-	LysSerAla ₂ B.animalis
PNC-2-9G	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	(+)	-	+	-	+	-	LysAla ₃ B.pseudolongum
F1,F2 St1 St1M,St7 S:8,St5 Ms1 St3M	+	+	+	(+)	+	+	+	-	o	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	LysAsp B.adolescentis

Glukonat konnte nur von den Arten *B. suis*, *B. adolescentis*, *B. indicum*, *B. coryneforme*, *B. dentium*, *B. catenulatum*, außerdem auch von den Stämmen F 395 ("subtile"), F 158 und F 196 verwertet werden. Letztere beiden gehören der Art *B. angulatum* an, bei der weitere Stämme wie auch der Typstamm B 677 Glukonat nicht spalten konnten. Dasselbe Ergebnis erhielten auch Scardovi und Croviani (1974). Keine Übereinstimmung mit der Literatur ergab sich bei *B. suis* und *B. asteroides*. Der Typstamm *B. suis* SU 859 kann nach Matteuzzi et al. (1971) entgegen unseren Befunden Glukonat nicht spalten. *B. asteroides* dagegen sollte laut Scardovi und Trovatielli (1969) Glukonat verwerten können.

Glukonat-6-Phosphat kann von keiner Art, auch nicht von Glukonat vergärenden Stämmen, zum Wachstum genutzt werden.

IV. S c h l u ß b e t r a c h t u n g

Es hat sich gezeigt, daß die Gattung Bifidobacterium Orla-Jensen (1924) recht gut charakterisiert ist. Die Zugehörigkeit zu einer bestimmten Familie ist dagegen immer noch umstritten. Vorgeschlagen wurde die Zuordnung zu den Lactobacillaceae (Holland, 1920; Orla-Jensen, 1924; Weiss, 1933; Weiss und Rettger, 1934; 1938; Norris et al., 1950; György et al., 1954; 1955; Reuter, 1964), den Actinomycetaceae (Vuillemin, 1931; Nannizzi, 1934; Puntoni, 1936; 1937; Orla-Jensen et al., 1936; Prévot, 1938; 1961; 1970; Negroni und Fischer, 1944; Frank und Skinner, 1954; Sundman et al., 1959; Pine und Georg, 1965; Pine, 1970) oder den Corynebacteriaceae (Olsen, 1949; von Plotho, 1949).

1. Beziehung der Gattung Bifidobacterium zu den Familien Corynebacteriaceae, Actinomycetaceae und Lactobacillaceae.

1.1. Corynebacteriaceae.

Das wichtigste Argument für eine Zuordnung der Bifidobakterien zu den Corynebakterien beruhte auf der unregelmäßigen Form der Keime bei Kultivierung in künstlichen Medien, obwohl im natürlichen Biotop, also unter nutritiv günstigen Bedingungen, fast nur regelmäßig geformte Stäbchen auftreten (siehe Einleitung). Demgegenüber besitzen die "coryneformen" Bakterien im natürlichen wie auch künstlichen Milieu die gleiche Form.

Auch die Art der Zellteilung, die bei Corynebakterien aufgrund des charakteristischen Umklappens ("snapping division") der sich teilenden Zellen zu pallisaden- oder winkelförmiger Anordnung der Zellen führt, spricht gegen eine Zuordnung der Bifidobakterien zu den Corynebakterien, da bei ersteren die Zellteilung zu geradlinigen Kettenformationen führt. Ferner ist für bestimmte coryneforme Bakterien die Bildung von Arthrosporen (Genus *Arthrobacter*) charakteristisch, die jedoch bei Bifidobakterien in keinem Fall beobachtet werden konnte.

Eine morphologisch begründete Zuordnung der Bifidobakterien zu den coryneformen Bakterien ist daher sehr zweifelhaft.

Auch für eine nähere Verwandtschaft in stoffwechselphysiologischer Hinsicht finden sich kaum Argumente, denn die Bifidobakterien sind obligat anaerob, die coryneformen Bakterien dagegen obligat aerob bis fakultativ anaerob. Vergleicht man die Gärungsprodukte der fakultativ anaeroben Corynebakterien, nämlich die Arten C.acnes, C.avidum, C.anaerobium, C.parvum und C.diphtheroides (Prévot, 1957; Bergey et al., 1957; Werner, 1964; Werner et al., 1966) mit denen der

Bifidobakterien, so ergibt sich eine klare Unterscheidung, da erstere Glukose hauptsächlich zu Propionsäure, Essigsäure, CO_2 und kleineren Mengen an Milchsäure und Bernsteinsäure (Werner, 1966; Pine, 1970; Moore, 1970) vergären und damit ein völlig anders geartetes Spektrum an Endprodukten aufweisen als Bifidobakterien.

Auch der Besitz oder das Fehlen von charakteristischen Enzymen ist bei einem derartigen Vergleich von großer Bedeutung. So konnte die für Bifidobakterien charakteristische Phosphoketolase bei coryneformen Bakterien bisher nicht nachgewiesen werden (Scardovi und Trovatelli, 1965).

1.2. Actinomycetaceae.

Bei der Familie Actinomycetaceae gilt bisher nur die Gattung Actinomyces als taxonomisch gesichert. Die ihr angehörenden Arten sind unabhängig vom Medium durch filamentöses Wachstum und durch Bildung echter Verzweigungen charakterisiert. Da auch Bifidobakterien bei Kultivierung in künstlichen Medien häufig verzweigt sind, sahen einige Autoren darin ein Argument für eine nähere Verwandtschaft zu den Actinomyceten. Wie jedoch bereits erwähnt (siehe Einleitung), sind Bifidobakterien unter natürlichen Wachstumsbedingungen regelmäßig geformte Stäbchen, die morphologisch kaum mit Actinomyceten in Beziehung gebracht werden können.

Die Unterscheidung der Actinomyceten und Bifidobakterien aufgrund der Gärungsprodukte ist nicht so offensichtlich wie im Falle der Corynebakterien, da unter anaeroben Bedingungen qualitativ die gleichen Produkte aus Glukose entstehen wie bei Bifidobakterien. Quantitative Unterschiede ergeben sich aus den gänzlich verschiedenen Abbaumechanismen, da die Actinomyceten die Glukose gleich den homofermentierenden Lactobazillen hauptsächlich zu Laktat abbauen. Ein Teil des intermediär gebildeten Pyruvats kann phosphoroklastisch zu Formiat und Azetat gespalten werden (Buchanan und Pine,

1963; 1967), wie wir dies auch bei Bifidobakterien gezeigt haben. Während aber bei den Actinomyceten der Ausgleich der Wasserstoffbilanz hauptsächlich durch Bildung von Succinat erfolgt, wobei beträchtliche Mengen an CO_2 fixiert werden, wird bei Bifidobakterien wie auch bei Lactobazillen ein Teil des Azetats zu Äthanol reduziert und auch in Anwesenheit von CO_2 nur recht wenig Succinat gebildet. Weitere Unterschiede ergeben sich hinsichtlich der Säuretoleranz, die bei Actinomyceten geringer ist als bei Bifidobakterien oder Lactobacillen. Dementsprechend verschieden ist der Glukoseverbrauch. Actinomyceten vergären maximal nur 30 μM Glukose, Bifidobakterien dagegen bis zu 50 μM Glukose pro ml Medium (Pine und Howell, 1956; Werner, 1966).

Pine (1970) folgte aufgrund von Versuchen, bei denen er A.israelii mit C-1-C¹⁴- bzw. C-6-C¹⁴-Glukose fütterte, daß F-6-P-Phosphoketolase bei der Bildung von Azetat beteiligt sein müsse und hierdurch eine verwandtschaftliche Beziehung zu Bifidobakterien ersichtlich sei. Dies steht aber nicht im Einklang mit Versuchen von Scardovi und Trovatelli (1965), die das entsprechende Enzym in zellfreien Extrakten verschiedener Arten von Actinomyceten nicht nachweisen konnten. Wohl mag bei einzelnen Stämmen, die bei Kultivierung in Gegenwart von Ribose als Substrat zu wachsen vermögen (Pine und Howell, 1956), eine Phosphoketolase induzierbar sein, wenn dies bisher auch nicht bewiesen wurde. Der wesentliche Unterschied zwischen Bifidobakterien und Actinomyceten scheint uns jedoch der Besitz bzw. das Fehlen der Phosphoketolase bei Kultivierung mit Glukose als Substrat zu sein.

Die Zellwandzusammensetzung wurde ebenfalls als ein Argument für eine nähere Verwandtschaft angeführt (Pine, 1970), da Ornithin und Lysin bei Bifidobakterien wie bei Actinomyceten in der gleichen Zellwand häufig gemeinsam auftreten. Es stellte sich jedoch heraus, daß die beiden Diaminosäuren

bei Bifidobakterien alternativ die Position 3 der Peptiduntereinheit einnehmen, aber niemals ein Bestandteil der Interpeptidbrücke darstellen. Bei Actinomyceten dagegen ist die Position 3 der Peptiduntereinheit durch Lysin besetzt, während Ornithin nur auf die Quervernetzung beschränkt ist (Schleifer und Kandler, 1972). Dieser Befund spricht also eher gegen als für eine nähere Verwandtschaft.

1.3. Lactobacillaceae.

Die Heterofermentation der Bifidobakterien unterscheidet sich qualitativ von der der heterofermentierenden Lactobazillen (Betabakterien) und Leuconostoc durch das Fehlen der CO_2 -Bildung. Dies beruht darauf, daß Lactobazillen nur eine Xylulose-5-P-Phosphoketolase besitzen, während bei Bifidobakterien auch noch eine Fruktose-6-P-Phosphoketolase vorkommt, wodurch die Hexosen ohne vorhergehende, oxidative Dekarboxylierung zu Pentosen umgewandelt werden können. Die anschließende Spaltung der Pentosen (bzw. die Vergärung von Pentosen) sowie alle weiteren katabolischen Reaktionen stimmen bei den beiden Formen überein. Auf enzymatischer Ebene wird der Unterschied ferner noch dadurch gemildert, daß alle bisher untersuchten, induzierbaren (Heath et al., 1958) oder konstitutiven Phosphoketolasen (Goldberg und Racker, 1962; Schramm et al., 1958) in vitro sowohl Xylulose-5-P als auch Fruktose-6-P spalten können. Da bei Bifidobakterien auch noch die Glukonat-6-P-Dehydrogenase vorkommt und praktisch nur die Glukose-6-P-Dehydrogenase fehlt oder zu geringe Aktivität besitzt, kann man sich die phylogenetische Entwicklung beider Stoffwechselwege aus einer gemeinsamen Vorstufe gut vorstellen.

Auch zu anderen Gattungen der Familie Lactobacillaceae sind solche phylogenetischen Beziehungen erkennbar. So ist bei homofermentativ Milchsäure bildenden Streptobakterien, Streptokokken und Pediokokken die Induktion einer Phospho-

ketolase durch Pentosen möglich (Heath et al., 1958). Nur bei den Thermobakterien scheint dies nicht der Fall zu sein. Somit reiht sich der Abbauweg der Bifidobakterien in die bei Lactobazillen bekannten Variationen zwanglos ein, wenn man die Reihe Thermobakterien, Streptobakterien, Betabakterien und Bifidobakterien betrachtet.

Die Zusammensetzung des Mureins ist teils ein artspezifisches, teils ein gattungsspezifisches Merkmal, das ebenfalls gewisse phylogenetische Beziehungen zwischen verschiedenen Gattungen erkennen läßt. Während bei Thermobakterien und Streptobakterien (Ausnahme: L. plantarum) regelmäßig Murein vom Lys-Asp-Typ vorkommt, setzt im Bereich der Betabakterien eine stärkere Variabilität beim Aufbau der Interpeptidbrücke ein, wobei statt Asparaginsäure häufig Alanin und Serin in unterschiedlicher Kombination auftreten. Bei *Leuconostoc* kommt Asp überhaupt nicht mehr vor, sondern nur noch Interpeptidbrücken aus Ala und Ser. Bei Streptokokken ist die Variabilität noch stärker, da hier außer den schon genannten Aminosäuren, Asp, Ala, Ser, auch noch Glycin und Threonin am Aufbau der Interpeptidbrücke beteiligt sein können. Die höchste Variabilität und Vielfalt an Kombinationen tritt schließlich bei den Bifidobakterien auf, bei denen außer den zuvor genannten Aminosäuren, Asp, Ala, Ser, Gly, Thr, auch noch Glutaminsäure als Interpeptidbrücke vorkommt.

Trotz der hohen Variabilität der Aminosäuresequenz der Interpeptidbrücke ist das Murein bei Bifidobakterien nach dem gleichen Grundschema wie bei Lactobazillen aufgebaut. Dies betrifft insbesondere die Art der Verknüpfung zweier benachbarter Peptiduntereinheiten. Sie erfolgt stets zwischen dem C-terminalen D-Ala der einen und der Diaminosäure in Position 3 der anderen Peptiduntereinheit.

Auch die Zusammensetzung des Polysaccharids der Zellwand unterscheidet die Bifidobakterien von den Actinomyceten mehr

als von den Lactobazillen. Bei ersteren sind Glukose, Galaktose, Rhamnose, bei einigen Lactobazillen zusätzlich auch noch Glukosamin und Galaktosamin in unterschiedlicher Zusammensetzung am Aufbau beteiligt. Nur selten treten auch noch 6-Desoxytalose, Fukose oder Ribose auf. Mannose dagegen, die bei Actinomyceten sehr weit verbreitet zu sein scheint (Pine, 1970), kommt dagegen bei Bifidobakterien und Lactobazillen trotz der starken Variabilität bei der Zusammensetzung nicht vor. Eine detailliertere Aussage kann hier jedoch noch nicht gemacht werden, da über die Primärstruktur dieser Polysaccharide noch wenig bekannt ist.

weitere chemotaxonomische Beziehungen zwischen Bifidobakterien und Lactobazillen ergeben sich aufgrund der Eigenschaften der Laktat-Dehydrogenasen. Bei allen Bifidobakterien konnten wir eine hitzestabile, durch FDP allosterisch regulierte, NAD-abhängige L-LDH nachweisen. Ähnliche, allosterisch regulierte L-LDH kommen auch bei Lactobazillen (Streptobakterien) (de Vries et al., 1970; Stetter, 1973) und insbesondere bei Streptokokken (Wolin, 1964; Wittenberger und Angelo, 1970; Jago et al., 1971; Jonas et al., 1972; Mou et al., 1972) vor.

2. Neugliederung der Gattung Bifidobacterium Orla-Jensen (1924) aufgrund der erarbeiteten Daten.

Tab. 19 gibt einen Überblick über die biochemischen und physiologischen Merkmale der verschiedenen, von uns und Koch (1969) untersuchten Arten bzw. Stämme. In der ersten Spalte ist die bisherige Art- bzw. Stammbezeichnung angegeben. Die letzte Spalte enthält das Differenzierungsergebnis. Die von uns vorgenommene Differenzierung von Arten oder Unterarten richtet sich nach

- 1) dem Mureintyp,
- 2) der elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit der LDH und der F-6-P-Phosphoketolase (Scardovi et al., 1971 bis 1974),

aller untersuchten Bifidobakterien.

Tab.19: Übersicht über die biochemischen und physiologischen Merkmale

Spezies/Stamm	Anzahl der Stämme	Stamm-Nummer des untersuchten Typus	Herkunft ⁺⁺⁾	Zusammensetzung der Zellwände	
				Mureintyp	Polysaccharid ⁺⁺⁺⁾ Glc Gal Rham
<i>B. bifidum</i>	6	-	FA, FB	Orn(Lys)-Ser-Asp	+ + + +
<i>B. infantis</i>	7	S 12	FB	Lys-Gly	+ + + +
<i>B. liberorum</i>	1	S 76 a	FB	Lys-Gly	+ + + +
<i>B. breve</i>	9	S 1	FB	Lys-Gly	+ + + +
<i>B. pervalvorum</i>	5	ATCC 15698 (S 50)	FB	Lys-Gly	+ + + +
<i>B. asteroides</i>	1	C 51	Biene	Lys-Gly	+ + + -
<i>B. lactentis</i>	1	659	FB	Orn(Lys)-Ser-Ala-Thr-Ala	+ + + -
<i>A. parabifidus</i> ATCC 17930	1	-	FA	Orn(Lys)-Ser-Ala-Thr-Ala	+ (+) -
<i>B. longum</i> var. <i>longum</i>	25	ATCC 15707, E 194 b	FA, FB	Orn(Lys)-Ser-Ala-Thr-Ala	+ + + v
<i>B. longum</i> var. <i>animalis</i>	1	C 10-45	Kalb	Orn(Lys)-Ser-Ala-Thr-Ala	+ + + -
<i>B. suis</i>	1	SU 859	Schwein	Orn(Lys)-Ser-Ala-Thr-Ala	+ + + (+)
<i>B. animalis</i>	6	R 101-8	Ratte, Kücken	Orn(Lys)-Ser-Ala ₂	v + + +
<i>B. spec. P 6</i>	1	-	FA	Lys-Ser-Ala ₂	+ + + -
<i>B. adolescentis</i> B 618	1	-	FB	Lys(Orn)-Ser-Ala ₂	+ + + -
<i>B. pseudolongum</i>	4	PNC-2-9G	Schwein, Pansen	Orn(Lys)-Ala ₂ -3	v + + +
<i>B. globosum</i>	2	RU 224	Pansen	Orn(Lys)-Ala ₃	Spur + +
<i>B. magnum</i>	7	RA 3	Kaninchen	Lys(Orn)-Ala ₂ -Ser	+ + + -
<i>B. catenulatum</i> B 676 ¹⁾	5	-	FA, Abwasser	Lys(Orn)-Ala ₂ -Ser	v + + -
<i>B. spec. F 392</i> ("minimum")	1	F 392	Abwasser	Lys-Ser	+ + + +
<i>B. spec. F 395</i> ("subtile")	1	F 395	Abwasser	Lys-Asp	+ + + -
<i>B. adolescentis</i>	26	ATCC 15703 (E 194 a)	FA, Abwasser	Orn(Lys)-Asp	+ + + v
<i>B. dentium</i>	8	-	FA, Mund	Lys(Orn)-Asp	- + + -
<i>B. catenulatum</i>	2	B 669	FA, Abwasser	Lys-Asp	v + + -
<i>B. angulatum</i>	6	B 677	FA, Abwasser	Lys-Asp	v (+) v
<i>B. appendicitis</i>	2	-	Appendicitis	Orn(Lys)-Asp	- + + -
<i>A. eriksonii</i>	1	ATCC 15423	Lungenabzehr	Orn(Lys)-Asp	- + + -
<i>B. indicum</i>	1	C 410	Biene	Lys-Asp	- + + +
<i>B. corvinaeforme</i>	4	C 215/24	Biene	Lys-Asp	- + + +
<i>B. thermophilum</i>	5	P 2-91	Schwein	Orn(Lys)-Glu	+ + + v
<i>E. ruminale</i>	4	RU 326	Pansen	Orn(Lys)-Glu	(+) + + v

Tabelle 19 Fortsetzung

Spezies/Stamm	Anzahl der Stämme	Elektrophoretische Mobilität ++++ LDH F-6-P-PK	Glukonat	Arabinose	Xylose	Ribose	Mannit	Differenzierungsergebnis
<i>B. bifidus</i>	6	4,5 15	-	-	-	-	-	<i>B. bifidum</i>
<i>B. infantis</i>	7	4,5 15	-	-	-	+	7/4	<i>B. breve</i>
<i>B. liberorum</i>	1	4,5 n.b.	-	-	-	-	-	
<i>B. breve</i>	9	4,5 15	-	-	-	+	+	
<i>B. parvulorum</i>	5	4,5 n.b.	-	-	-	-	-	
<i>B. asteroides</i>	1	4,5 16	7/-	+	+	(+)	-	<i>B. asteroides</i>
<i>B. lactentis</i>	1	4,5 n.b.	-	-	+	-	+	<i>B. longum</i>
<i>A. parvifidus</i> ATCC 17930	1	4,5 n.b.	-	-	+	+	-	
<i>B. longum</i> var. <i>longum</i>	25	4,5 15	-	-	+	+	-	
<i>B. longum</i> var. <i>animalis</i>	1	4,5 10	-	+	+	+	+	
<i>B. suis</i>	1	4,5 10	7/+	+	+	+	7/+	<i>B. suis</i>
<i>B. animalis</i>	6	3,4 10	-	+	+	+	-	<i>B. animalis</i>
<i>B. spec. P 6</i>	1	5,6 n.b.	-	+	+	+	-	<i>B. spec.</i>
<i>B. adolescentis</i> B 618	1	4,5 n.b.	+	+	+	+	0	<i>B. spec.</i>
<i>B. pseudolongum</i>	4	5,6 10	-	+	+	+	-	<i>B. pseudolongum</i>
<i>B. globosum</i>	2	5,6 10	-	+	+	+	-	
<i>B. magnum</i>	7	5,6 10	-	+	+	+	7/0	<i>B. magnum</i>
<i>B. catenulatum</i> B 676 [†]	5	4,5 15	+	+	(+)	+	7/0	<i>B. spec.</i>
<i>B. spec. F 392</i> ("minimum")	1	4,5 10	-	-	-	7/0	7/0	<i>B. spec.</i>
<i>B. spec. F 395</i> ("subtile")	1	4,5 15+10	+	-	7/0	7/0	7/0	<i>B. spec.</i>
<i>B. adolescentis</i>	26	4,5 15	+	+	+	+	+	<i>B. adolescentis</i>
<i>B. dentium</i>	8	4,5 15	+	+	+	+	7/0	
<i>B. catenulatum</i>	2	4,5 15	+	+	+	+	7/0	
<i>B. angulatum</i>	6	4,5 15	+	+	+	+	7/0	
<i>B. appendicitis</i>	2	4,5 15	+	+	+	+	0	
<i>A. eriksonii</i>	1	4,5 n.b.	+	+	+	+	+	
<i>B. indicum</i>	1	5,6 16	+	+	+	+	+	<i>B. indicum</i>
<i>B. corviforme</i>	4	5,6 16	+	+	+	+	+	
<i>B. thermophilum</i>	5	4,5 10	-	-	-	-	-	<i>B. thermophilum</i>
<i>E. ruminale</i>	4	4,5 10	-	-	-	-	-	

+) *B. catenulatum* B 676, B 684, F 44, F 144, F 171

++) F = Faeces, A = erwachsener Mensch ("Mischkötler"), B = Säugling.

+++) Glc = Glukose, Gal = Galaktose, Rham = Rhamnose

+ = positiv, - = negativ, (+) = schwach bzw. verzögert positiv, v = variabel, o = n.b. = nicht bestimmt bzw. nicht bekannt, -/o bzw. +/o = laut Literatur negativ bzw. positiv,

-/+ bzw. +/- = laut Literatur anderes Ergebnis,

++++) LDH = FDP-aktivierte, NAD-abhängige L-Laktat-Dehydrogenase, F-6-P-PK = Fruktose-6-P-Phosphoketolase

- 3) der Vergärung von Glukonat, Arabinose, Xylose und Ribose,
- 4) der DNS-Homologie (Scardovi et al., 1970 bis 1974).

a) B.bifidum (Tissier) Orla-Jensen (1924).

Die Art B.bifidum ist der Typus der Gattung. Sie ist durch den Mureintyp Orn(Lys)-D-Ser-D-Asp, der bei keiner anderen Art vorkommt, gut charakterisiert. Das Polysaccharid der Zellwände aller 6 Stämme besteht aus Glukose, Galaktose und Rhamnose. Für diese Art ist ferner bezeichnend, daß nur relativ wenige Zucker vergoren werden. Pentosen werden nicht angegriffen. Die DNS-Homologie zu anderen Arten (0 bis 42 %) ist gering, so daß keinerlei Zweifel an der Eigenständigkeit dieser Art besteht.

b) B.breve, B.parvulorum, B.infantis und B.liberorum (Reuter, 1964).

Die Arten B.breve, B.parvulorum, B.infantis und B.liberorum, die bisher fast ausschließlich aus dem Darm des Säuglings isoliert wurden (Reuter, 1964; Mitsuoka, 1969), besitzen Murein vom Lys-Gly-Typ und verhalten sich auch in allen anderen Merkmalen (Tab.19) praktisch einheitlich. Unterschiede ergeben sich nur bei der Vergärung einiger Oligosaccharide, Zuckeralkohole und Glukoside. Von den Pentosen wird einheitlich nur Ribose vergoren. Für B.liberorum wird in der Literatur (Reuter, 1964; Mitsuoka, 1969) die Vergärung von Xylose angegeben, doch konnten wir dies nicht bestätigen. Aufgrund dieser Einheitlichkeit sind wir der Ansicht, daß es sich bei dieser Reihe von Arten nur um eine Art handelt. Da die genannten Artbezeichnungen auf die gleiche Veröffentlichung (Reuter, 1964) zurückgehen, ist die Frage nach der Priorität etwas problematisch, dies umso mehr als drei dieser Bezeichnungen auf derselben Seite (S. 502) genannt werden. Der Bezeichnung B.breve kommt "Zeilen-Priorität" zu, da diese Art

zuerst genannt wird. Die anderen Artnamen sind demnach Synonyma von B.breve.

Zu einer abweichenden Beurteilung dieser Gruppe von Arten kamen Scardovi et al. (1972) aufgrund der DNS-Homologie. Innerhalb der Paare, B.infantis und B.liberorum bzw. B.breve B.parvulorum ergab sich jeweils hohe Ähnlichkeit der DNS (über 70 %), während zwischen den beiden Paaren nur geringe Homologie (24 bis 45 %) besteht. Hieraus entstand die Ansicht, daß B.liberorum synonym zu B.infantis und B.parvulorum synonym zu B.breve sei (Scardovi et al., 1972), während B.infantis und und B.breve als eigenständige Arten bestehen bleiben sollten.

Vergleicht man jedoch diese Homologie-Werte mit den von den gleichen Autoren bei zahlreichen Stämmen anderer Arten bestimmten, so sieht man, daß zwischen Stämmen ein und derselben Art Homologiegrade von 60 bis 100 % (oder sogar mehr) vorkommen. Angesichts dieser hohen Variabilität erscheint uns eine Trennung der beiden Arten B. infantis und B. breve, von denen jeweils nur ein oder zwei Stämme untersucht wurden, nur aufgrund der etwas geringeren DNS-Homologie sehr fragwürdig.

c) B.asteroides Scardovi und Trovatelli (1969).

Die Art B.asteroides, die aus einem völlig anderen Biotop als B.breve, nämlich aus dem Intestinaltrakt der Biene isoliert wurde, weist zwar ebenfalls den Lys-Gly-Typ auf, unterscheidet sich jedoch von dieser Art durch eine Reihe anderer Merkmale. So fehlt Rhamnose im Zellwandpolysaccharid, die Wanderungsgeschwindigkeit der Phosphoketolase ist verschieden und die Vergärung der Pentosen positiv. Entgegen den Angaben von Scardovi und Trovatelli (1969) ist die Spaltung von Glukonat negativ. B.asteroides unterscheidet sich demnach in so vielen Merkmalen von B.breve, daß die

Aufrechterhaltung dieser Art gerechtfertigt erscheint. Diese Ansicht wird auch dadurch gestützt, daß nach Scardovi et al. (1970) praktisch keine DNS-Homologie zu B.breve oder anderen Arten (0 bis 33 %) besteht.

d) B.lactentis, A.parabifidus, B.longum var.longum und B.longum var.animalis.

Eine weitere Gruppe von Arten weist den Orn(Lys)-Ser-Ala-Thr-Ala-Typ auf. Dazu gehören die zahlreichen, aus dem Stuhl von Säuglingen und Erwachsenen isolierten Stämme von B.longum. Von B.lactentis existiert nur noch ein einziger Stamm, obwohl derartige Stämme von Dehnert (1957) häufig isoliert und als "typischer Brustkindbifidus" bezeichnet worden waren. In den ausführlichen Untersuchungen von Reuter (1964) und Mitsuoka (1969) konnten aber solche Stämme nicht wieder isoliert werden. Auch von A.parabifidus (Weiss und Rettger, 1938) Pine und Georg (1965) war nur noch ein Stamm, der von Norris et al. (1950) aus dem Darm eines Erwachsenen isoliert worden war, verfügbar. Nach unseren Befunden handelt es sich mit Sicherheit um einen echten Vertreter der Bifidobakterien, nicht um einen der Gattung Actinomyces, wie Pine und Georg (1965) annahmen.

B.lactentis und A.parabifidus unterscheiden sich von B.longum durch die fehlende Arabinose-Vergärung, während Ribose einheitlich vergoren wird. Das Fehlen von Rhamnose im Polysaccharid der Zellwände kann dagegen nicht als ein weiteres Unterscheidungsmerkmal angesehen werden, da ähnliche Varianten auch bei Stämmen von B.longum vorkommen, wie vor allem Koch (1969) gezeigt hat (siehe Einleitung). Der Unterschied in der Arabinose-Vergärung ist unserer Meinung nach zu gering, um eine Trennung von Arten zu rechtfertigen. Wir sehen daher in den beiden genannten Stämmen nur Arabinose-negative Varianten von B.longum.

Zu einer anderen Auffassung kamen Scardovi et al. (1971) aufgrund der DNS-Homologie. Es zeigte sich nämlich, daß zwischen B.lactentis und B.longum nur etwa 45 % Homologie besteht, während zwischen B.lactentis und B.infantis oder B.liberorum DNS-Homologie von über 70 % auftrat. Man sollte nun erwarten, daß dann auch B.breve und B.parvulorum hohe Homologie zu B.lactentis aufweisen. Dies bestätigte sich jedoch nicht, da nur 22 bis 57 % Homologie zu B.parvulorum und gar nur 17 bis 25 % zu B.breve festgestellt werden konnten. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde angenommen, daß B.lactentis synonym mit B.infantis und B.liberorum sei, während die Synonyma B.breve und B.parvulorum eine eigene Art bezeichnen sollen.

Die Richtigkeit dieser Unterscheidung müssen wir jedoch aufgrund der Zusammensetzung des Mureins anzweifeln. Es wäre denkbar, daß bei den Untersuchungen von uns und denen von Scardovi et al. (1971) nicht der gleiche Organismus vorlag, obwohl es sich in beiden Fällen um den einzigen, noch existierenden Stamm 659 von B.lactentis handeln soll. Zweifel an der Identität verschiedener Reihen von Folgekulturen sind in der Bakteriologie immer berechtigt und können nur durch kritische Überprüfung ausgeräumt werden. Wir planen daher Untersuchungen des Mureins und der DNS-Homologie an Zellmaterial aus ein und derselben Charge.

Nach unserer Auffassung sind die von uns untersuchten Stämme von A.parabifidus, B.lactentis und B.longum identisch, und es ergibt sich die Frage, welche Artbezeichnung Priorität besitzt. Das älteste Epitheton ist "parabifidus", da es auf Weiss und Rettger (1938) zurückgeht, während B.lactentis und B.longum erst viel später durch Reuter (1964) eingeführt wurden. Allerdings ist die Bezeichnung L.parabifidus mit einer sehr konfuse Geschichte verknüpft (siehe Einleitung), und A.parabifidus ATCC 17030 ist weder ein Original- noch ein

Typstamm (siehe Einleitung), so daß man hier wohl von einem "nomen dubium" sprechen kann, während B.longum eine klar definierte Art darstellt. Da B.longum und B.lactentis in der gleichen Veröffentlichung von Reuter (1964) benannt wurden, B.longum aber 2 Seiten früher erwähnt wird, kommt dieser Bezeichnung "Seiten-Priorität" zu.

Über die Artzugehörigkeit des Stammes B.longum var. animalis C 10-45 (Mitsuoka, 1969) herrscht noch Uneinigkeit. Derartige Stämme waren aus der Faeces von Kalb und Schaf isoliert worden und weisen mit Ausnahme der fehlenden Vergärung von Melezitose das gleiche Spektrum an vergärbaren Kohlenhydraten auf wie E.longum. Nach unseren Befunden ist dieser Stamm auch hinsichtlich aller übrigen Merkmale (Tab.19) mit B.longum identisch.

Ein völlig anderes Bild ergab sich wiederum aufgrund der DNS-Homologie (Scardovi et al., 1971). Während zu B.longum nur 9 % Homologie gefunden wurde, ergab sich zu B.pseudolongum eine unerwartet hohe Homologie von 70 bis 100 %, obwohl hier völlig verschiedene Mureintypen und verschiedene, elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeiten der LDH vorliegen (siehe Tab.19). Dieser krasse Widerspruch weckt erneut Zweifel an der Identität des bei uns und bei Scardovi et al. (1971) untersuchten Stammes, und es läßt sich hier prinzipiell das gleiche sagen wie im Falle von B.lactentis (siehe oben). Eine entsprechende Überprüfung ist daher geplant.

e) B.suis Matteuzzi et al. (1971).

Dem gleichen Mureintyp wie B.longum gehört auch die Art B.suis an, die aus der Faeces von Schweinen isoliert wurde. Der von uns untersuchte Typstamm B.suis SU 859 unterscheidet sich von B.longum durch die Wanderungsgeschwindigkeit der Phosphoketolase und durch die Vergärung von Glukonat und Mannit, die allerdings

bei Matteuzzi et al. (1971) als negativ bezeichnet worden war. Als weiteres Unterscheidungsmerkmal gaben Matteuzzi und Crociani (1973) an, daß B.suis im Gegensatz zu anderen Bifidobakterien Urease besitzt. Da die DNS-Homologie zu B.longum (0 %) und zu anderen Arten (0 bis 38 %) sehr gering ist (Scardovi et al., 1970; 1971; Matteuzzi et al., 1971), handelt es sich wohl um eine eigenständige Art.

f) B.animalis (Mitsuoka) Scardovi und Trovatelli (1974).

Die aus der Faeces von Kücken, Kalb, Ratte, Meerschweinchen und Abwasser isolierte Art B.animalis besitzt Murein vom Orn(Lys)-Ser-Ala₂-Typ. Das Polysaccharid der Zellwände besteht mit Ausnahme des Typstamms, der keine Glukose enthält, aus Glukose, Galaktose und Rhamnose. Die Spezies ist durch die elektrophoretisch sehr langsam wandernde LDH charakterisiert, die bei keiner anderen Art auftrat. Die Arabinose-Vergärung war mit Ausnahme nur eines Stammes (P 23) wie bei Scardovi und Trovatelli (1974) positiv, bei Moore (vgl. Scardovi und Trovatelli, 1974) dagegen einheitlich negativ. Dies zeigt, daß die Vergärung von Pentosen zuweilen mit Unsicherheiten behaftet ist und zur Fehldifferenzierung Anlaß geben kann, wenn man sie als entscheidendes Schlüsselmerkmal benützt.

Da auch die DNS-Homologie zwischen B.animalis und anderen Arten (0 bis 34 %) kaum nähere verwandtschaftliche Beziehungen erkennen läßt, handelt es sich wohl um eine eigenständige Art.

g) B.spec. P6, B.spec. B 618.

Murein vom Orn(Lys)-Ser-Ala₂-Typ fanden wir noch bei zwei weiteren Stämmen, B.spec.F 6 (Koch, 1969) und B.adolescentis B 618, die sich jedoch von B.animalis und auch voneinander durch die elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit der LDH unterscheiden. Sie stammen beide aus dem Darm des Menschen.

Das Spektrum der vergorenen Kohlenhydrate gleicht dem von B.adolescentis, nur vermag der Stamm P 6 kein Glukonat zu spalten. Aufgrund der Verschiedenheit dieser beiden Stämme voneinander und von B.animalis nehmen wir an, daß es sich jeweils um Vertreter verschiedener Arten handelt. Artbezeichnungen können jedoch erst dann gegeben werden, wenn mehrere derartige Stämme isoliert worden sind. Die Bezeichnung B.adolescentis B 618 wurde von Scardovi (pers. Mitt., 1972) gewählt, weil die DNS dieses Stammes hohe Homologie zu der von B.adolescentis E 298 b aufwies (genauere Angaben sind uns jedoch nicht bekannt). Gegen diese Artzugehörigkeit spricht der völlig verschiedene Mureintyp (siehe unten).

Beim Stamm P 6 liegen noch keine Untersuchungen der DNS-Homologie vor.

h) B.pseudolongum, B.globosum.

Die beiden Arten B.pseudolongum und B.globosum besitzen Murein von Orn(Lys)-Ala₂₋₃-Typ und stimmen auch in allen übrigen Merkmalen überein. Da zwischen beiden Arten auch hohe DNS-Homologie (über 65 %) besteht, handelt es sich mit Sicherheit nur um eine Art. Die Homologie zu anderen Arten ist nur gering (0 bis 35 %). Da die Beschreibung von B.pseudolongum (Mitsuoka, 1969) zuerst erschien, kommt dieser Bezeichnung Priorität zu, während B.globosum (Scardovi et al. 1969) hierzu synonym ist.

i) B.magnum Scardovi und Zani (1974).

Die Art B.magnum besitzt Murein vom Orn(Lys)-Ala₂-Ser-Typ. Sie wurde aus der Faeces von Kaninchen isoliert. Auffällig sind die besonders großen, keulig aufgeblähten Keime, die fast bei allen Stämmen zu sehen waren. Das Polysaccharid der Zellwände besteht einheitlich aus Glukose und Galaktose. Die elektrophoretische Mobilität der LDH entspricht dem schnell

wandernden Typ. Die Vergärung aller Pentosen ist positiv. Da auch die DNS-Homologie zu anderen Arten nur gering ist (0 bis 32 %), kann man das Vorliegen einer gut definierten Art annehmen.

j) B.spec.B. 676, B. 684, F 44, F 144 und F 171.

Eine Gruppe von Stämmen, B.catenulatum B 676, B 684, F 44, F 144 und F 171, gehört dem gleichen Mureintyp an wie B.magnum, stammt jedoch aus menschlicher Faeces und aus Abwasser. Sie unterscheiden sich von B.magnum durch die elektrophoretische Beweglichkeit der LDH und der Phosphoketolase (Scardovi und Zani, 1974; Scardovi und Crociani, 1974) und durch die Verwertung von Glukonat, Mannit und Salicin. Scardovi und Crociani (1974) hatten aufgrund hoher DNS-Homologie (über 80 %, siehe Tab. 3 B) zum Typstamm B 669 von B.catenulatum angenommen, daß es sich um Vertreter dieser Art handle. Nach unseren Befunden besitzen jedoch diese Stämme einen völlig anderen Mureintyp als B.catenulatum (siehe unten). Unserer Meinung nach handelt es sich also um eine andere Art (siehe Kapitel 1.1, Teil III. Ergebnisse). Ihre Eigenständigkeit bedarf aber wohl noch einer eingehenderen Überprüfung, bevor hier eine neue Art benannt werden kann.

k) B.spec. F 392.

Nur ein einziger Stamm, nämlich B.spec.F 392, der aus Abwasser stammt, enthielt Murein vom Lys-Ser-Typ, wodurch er sich von allen anderen Arten unterscheidet. Morphologisch eigentümlich sind die ausgesprochen kleinen, teilweise verzweigten Keime. Ähnlich wie bei B.bifidum werden nur sehr wenige Zucker angegriffen (Scardovi und Trovatelli, 1974). Da nur geringe DNS-Homologie (0 bis 25 %) zu anderen Arten besteht, handelt es sich wohl um einen Vertreter einer noch unbenannten Art. Allerdings konnten bisher nur zwei derartige

Stämme isoliert werden. Scardovi und Trovatelli (1974) stellten daher die endgültige Benennung der Art vorläufig noch zurück und sprechen in diesem Fall nur von der Gruppe "minimum".

- 1) B.adolescentis, B.dentium, B.catenulatum, B.angulatum,
B.appendicitis und A.eriksonii.

Die Gruppe von Arten, B.adolescentis, B.dentium, B.catenulatum, B.angulatum, B.appendicitis und A.eriksonii, besitzt Murein vom Orn(Lys)-Asp-Typ. Das Polysaccharid weist mehrere Variationen auf. Die elektrophoretische Beweglichkeit der LDH und der Phosphoketolase stimmt in allen Fällen überein. Das Spektrum der vergärbaren Zucker ist sehr ähnlich. Glukonat und alle Pentosen werden vergoren. Aufgrund dieser Übereinstimmung sind wir der Ansicht, daß es sich hier nur um eine Art handelt.

Nach Scardovi und Crociani (1974) ergab sich allerdings zwischen B.adolescentis E 298 b und den Arten B.dentium, B.catenulatum und B.angulatum nur eine relativ niedrige DNS-Homologie von 24 bis 49 %, 20 bis 57 % bzw. 20 bis 44 %, während bei Stämmen der "gleichen Art" nur hohe Homologie (über 65 %) erhalten wurde. Dies gab den Anstoß zur Unterscheidung der genannten Arten. Zu anderen Arten ergab sich nur geringe Homologie von 0 bis 26 %. Wir glauben daher, unsere Befunde dahingehend mit der DNS-Homologie vereinbaren zu können, daß B.dentium, B.catenulatum und B.angulatum als Unterarten von B.adolescentis (Reuter, 1964) aufgefaßt werden sollten.

Bei B.appendicitis ist nicht klar, welche Eigenschaften für diese Art charakteristisch sein sollen (siehe Einleitung). Die noch verfügbaren Stämme sind weder authentischen Ursprungs noch von B.adolescentis wie Tab.1^o zeigt zu unterscheiden. Dies steht im Einklang mit Mitsuoka (1969; pers.Mitt., 1970),

Scardovi (pers.Mitt., 1972) und Moore (pers.Mitt., 1973). Die Bezeichnung B.appendicitis muß man wohl als "nomen dubium" ansehen.

Auch A. eriksonii (George et al., 1965) erwies sich bei uns als identisch mit B. adolescentis. Zu dem gleichen Ergebnis kamen Mitsuoka et al. (1974), die bereits ausführlich begründeten, daß es sich bei A.eriksonii um ein "nomen rejiciendum" handelt. Die richtige Bezeichnung ist auch in diesem Fall B.adolescentis.

m) B.spec.F 395.

Der Stamm B.spec.F 395, der aus Abwasser isoliert wurde, besitzt ebenfalls Murein vom Lys-Asp-Typ. Er unterscheidet sich aber von B.adolescentis durch die fehlende Vergärung von Arabinose. Auch Xylose wird nur verzögert angegriffen. Nach Scardovi und Trovatelli (1974) ist die Vergärung von Xylose sogar negativ. Ferner wurde bei derartigen Stämmen der Besitz zweier elektrophoretisch verschieden wandernder Phosphoketolasen festgestellt, wodurch sich eine Unterscheidung zu allen anderen Arten ergibt. Die DNS-Homologie zu anderen Arten ist nur sehr gering (0 bis 23 %), so daß die Aufstellung einer eigenen Art sicherlich berechtigt wäre. Derartige Stämme konnten bisher allerdings nur selten isoliert werden, so daß Scardovi und Trovatelli (1974) zunächst nur eine provisorische Trennung von anderen Arten als Gruppe "subtile" vorgeschlagen haben.

n) B.indicum und B.coryneforme.

Die Arten B.indicum und B.coryneforme besitzen ebenfalls wie B.adolescentis und Stämme der Gruppe "subtile" Murein vom Lys-Asp-Typ, zeichnen sich aber durch das Vorkommen in einem besonderen Biotop, nämlich im Intestinaltrakt der Biene, aus. Die Unterscheidung von B.adolescentis und der Gruppe "subtile" wird durch die verschiedene, elektrophoretische Beweglichkeit

der LDH sowie der Phosphoketolase gestützt. B.indicum und B.coryneforme stimmen in diesen und allen übrigen Merkmalen (Tab.19) überein. Die DNS-Homologie zwischen beiden Arten ist hoch (über 60 %), die zu anderen Arten dagegen nur gering (0 bis 33 %). Wie hoch die Homologie zu B.adolescentis ist, geht aus der Literatur (Scardovi et al., 1970 bis 1974) leider nicht hervor. Dennoch dürfte außer Zweifel stehen, daß es sich bei B.indicum und B.coryneforme um eine eigenständige Art handelt. Beide Artbezeichnungen gehen auf die gleiche Veröffentlichung zurück (Scardovi und Trovatelli, 1969). B.indicum besitzt "Seiten-Priorität", so daß B.coryneforme als Synonym anzusehen ist.

o) B.thermophilum, B.ruminale.

Die beiden Arten B.thermophilum und B.ruminale sind durch Murein von Orn(Lys)-Glu-Typ charakterisiert, der bei anderen Arten nicht vorkommt. Die beiden aus der Faeces vom Schwein und aus Rinderpansen isolierten Arten verhalten sich in allen Merkmalen (Tab.19) gleich und sind demnach identisch. Die DNS-Homologie zwischen den beiden Arten ist hoch (über 60 %), zu anderen Arten dagegen niedrig (unter 35 %), so daß hier das Vorliegen einer eigenständigen Art als gesichert gelten kann. Da die Beschreibung von B.thermophilum früher (Mitsuoka, 1969) erschienen ist als die von B.ruminale (Scardovi et al., 1969) kommt ersterer Priorität zu, während letztere hierzu synonym ist.

V. Zusammenfassung

Biochemische und physiologische Untersuchungen an Vertretern aller Arten der Gattung Bifidobacterium Orla-Jensen (1924) sowie an Stämmen, deren verwandtschaftliche Beziehung zu dieser Gattung noch nicht klar ist, sollten dazu beitragen, die Berechtigung der Aufstellung der zahlreichen Arten zu überprüfen und zur Synonymie Stellung zu nehmen.

1.) Das Murein aller Arten gehört nach dem Gruppierungsvorschlag von Schleifer und Kandler (1972) zur Gruppe A. Das an die Muraminsäure gebundene Tetrapeptid weist die Sequenz L-Ala-D-Glu-L-Orn(L-Lys)-D-Ala auf, wobei die beiden Diaminosäuren L-Lys und L-Orn in ein und demselben Murein alternativ die Position 3 einnehmen können. In Bezug auf die Interpeptidbrücke ergaben sich 9 verschiedene Mureintypen: L-Orn(L-Lys)-D-Ser-D-Asp, L-Lys-Gly, L-Orn(L-Lys)-L-Ser-L-Ala-L-Thr-L-Ala, L-Orn(L-Lys)-L-Ser-L-Ala₂, L-Orn(L-Lys)-L-Ala₂₋₃, L-Orn(L-Lys)-L-Ala₂-L-Ser, L-Lys-L-Ser, L-Orn(L-Lys)-D-Asp, L-Orn(L-Lys)-D-Glu.

2.) Das Zellwandpolysaccharid besteht im wesentlichen aus Glukose, Galaktose und Rhamnose. Davon ist nur Galaktose bei allen Stämmen vorhanden. Aufgrund des Vorhandenseins oder Fehlens von Glukose und/oder Rhamnose kommen 4 verschiedene Kombinationen vor. Bei Stämmen einer Art ist die Zuckerzusammensetzung meist relativ einheitlich, im allgemeinen jedoch mehr stammspezifisch als artspezifisch.

3.1.) Die allosterische Aktivierbarkeit der NAD-abhängigen, relativ hitzebeständigen L-LDH durch FDP ist bei allen Arten verwirklicht. Phosphat wirkt gegenüber FDP als kompetitiver Inhibitor.

3.2.) Aufgrund der Wanderungsgeschwindigkeit der LDH bei der Disk-Elektrophorese im Polyacrylamidgel konnten innerhalb der Gattung 3 Typen unterschieden werden. Es handelt sich hierbei um ein artspezifisches Merkmal.

3.3.) Drei LDH wurden aufgrund der unterschiedlichen, elektrophoretischen Mobilität ausgewählt und genauer untersucht. Neben Unterschieden im Molekulargewicht wurden auch verschiedene pH-Optima festgestellt. Die kinetischen Eigenschaften waren bei pH 7,5 dagegen recht ähnlich. Für FDP und Pyruvat sind jeweils zwei co-operierende Bindungsstellen am Enzym vorhanden. Zwischen dem katalytischen und den allosterischen Bindungszentren besteht sowohl positiv homotrope als auch positiv heterotrope Kooperativität. Das allosterische Verhalten weist die Merkmale des allosterischen K-Systems auf.

3.4.) Bei B.pseudolongum tritt außerdem in Gegenwart von zweiwertigen Kationen im pH-Bereich ober- und unterhalb des pH-Optimums deutliche Umsatzförderung auf. Dies erinnert entfernt an die strikt Mn^{++} -(Fe^{++} , Co^{++}) und FDP-abhängige Aktivierung der L-LDH von L.casei und anderer Streptobakterien, doch unterscheidet sich diese von der bei B.pseudolongum durch die Spezifität für Schwermetallionen.

4.) Aldolase konnte bei keinem Stamm nachgewiesen werden.

5.) Glukose-6-P-Dehydrogenase konnte nur bei wenigen Stämmen gefunden werden. In diesen Fällen war allerdings die Aktivität nur sehr gering.

6.) 6-P-Glukonat-Dehydrogenase war bei allen Arten vorhanden. Die Aktivität ist in allen Fällen NADP-abhängig.

7.) Versuche zum Mechanismus der Variation der Gärungsprodukte zeigten, daß bei solchen Stämmen, die mehr Azetat bilden als theoretisch zu erwarten ist, ein Teil des intermediär entstehenden Pyruvats nicht zu Laktat sondern phosphoroklastisch zu Formiat und Azetat gespalten wird. Dies konnte anhand der Markierungsverteilung auf die Gärungsprodukte nach Vergärung von verschieden positionsmarkierter Glukose bewiesen werden. Hierbei war außerdem zu erkennen, daß das aus der Phosphoketolase-Spaltung und aus der phosphoroklastischen Spaltung entstandene Azetat gleich gut für die enzymatische Reduktion zu Äthanol verfügbar ist. Es liegt also keine Kompartimentierung bzw. keine an einen Multienzymkomplex gebundene Reduktion des aus Pyruvat entstandenen Azetats vor.

8.) Das Ausmaß der phosphoroklastischen Spaltung ist abhängig vom Entwicklungszustand der Kultur. Während der frühstationären Phase wird ein Maximum erreicht.

9.) Das Ausmaß der phosphoroklastischen Spaltung geht im sauren pH-Bereich (unter pH 6) zurück, so daß das intermediär gebildete Pyruvat praktisch nur noch zu Laktat reduziert wird. Gleichzeitig macht sich eine Hemmung der Gärung bemerkbar.

10.) Das Verhältnis Azetat zu Laktat ist mehr ein stammspezifisches als artspezifisches Merkmal und kann daher nicht zur Artdifferenzierung benutzt werden.

11.) Unter Berücksichtigung der Zellwandzusammensetzung, der elektrophoretischen Mobilität der LDH und der Phosphoketolase (Scardovi et al., 1971 bis 1974), sowie der Fähigkeit, Glukonat, Arabinose, Xylose und Ribose verwerten zu können, konnte die Zahl der bisher benannten Arten von 26 auf 16 verringert werden. Darin sind mehrere neue, aber noch unbenannte Arten enthalten.

12.) Die in der Literatur häufig erwogene Beziehung zu einer der drei Familien Actinomycetaceae, Corynebacteriaceae oder Lactobacillaceae wird eingehend diskutiert. Aufgrund der biochemischen und physiologischen Beziehungen zu den heterofermentativen Laktobazillen, die auch durch die Zellwandzusammensetzung gestützt wird, sollte die Gattung Bifidobacterium zu den Lactobacillaceae gestellt werden.

VI. L i t e r a t u r - V e r z e i c h n i s

Andrews, P. - The gel-filtration behaviour of proteins related to their molecular weights over a wide range. Biochem.J., 96, 595-605 (1965).

Atkinson, D.E. - Regulation of enzyme activity. Ann.Rev. Biochem. 35, 85-124 (1966).

Bergey, D.H., Breed, R., Hammer, B.W., Harrison, F.C. and F.M.Huntoon. - Bergey's Manual of Determinative Bacteriol., Ed.1, Williams and Wilkins, Baltimore. (1923).

Bergey, D.H., R.S.Breed, B.W.Hammer, F.M.Huntoon, E.G.D. Murray and E.C.Harrison. - Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 4th ed. The Williams and Wilkins Co., Baltimore (1934).

Bergey, D.H., R.S.Breed, E.G.D.Murray and A.P.Hitchens. - Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 5th ed. The Williams and Wilkins Co., Baltimore (1939).

Bergmeyer, H.U. - Methoden der enzymatischen Analyse. 2.Auflage, Verlag Chemie, Weinheim (1970).

Bergmeyer, H.U., E.Bernt, F.Schmidt und H.Stork. - in: Methoden der enzymatischen Analyse (H.U.Bergmeyer). 2.Auflage, Verlag Chemie, Weinheim (1970).

Bernt, E., I.Gutmann. - in: Methoden der enzymatischen Analyse (H.U.Bergmeyer). 2.Auflage, Verlag Chemie, Weinheim (1970).

- Bertrand, D. - Influence du regime alimentaire sur la fermentation d'indol dans l'organisme. Ann.Inst.Pasteur 27, 76 (1913). - in: Mitsuoka (1969).
- Blaurock, G. - Bifiduszüchtung auf zystinhaltigen Nährböden. Zentralbl.Bakteriol.Abt.I.Orig.144, 75-79 (1939).
- Boventer, K. - Bacterium bifidum und seine Bedeutung. Ergebn. Hyg. 26, 193-234 (1940).
- Breed, R.S., E.G.D.Murray and A.P.Hitchens. - Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 6th ed., The Williams and Wilkins Co., Baltimore (1948).
- Breed, R.S., E.G.D.Murray and N.R.Smith. - Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 7th ed., The Williams and Wilkins Co., Baltimore (1957).
- Brown, A.T. and C.L.Wittenberger. - Fructose-1,6-diphosphate dependent lactate dehydrogenase from a caryogenic Streptococcus" Purification and regulatory properties. J.Bacteriol. 110, 604-615 (1972).
- Buchanan, B.B. and L.Pine. - Factors influencing the fermentation and growth of an atypical strain of Actinomyces naeslundii. Sabouraudia 3, 26-39. - in: Pine (1970).
- Buchanan, B.B. and L.Pine. - Path of glucose breakdown and cell yields of a facultative anaerobe, Actinomyces naeslundii. J.Gen.Microbiol. 46- 225-236 (1967).
- Castellani, A. and A.J.Chalmers. - Manual of tropical medicine. 3rd.ed., William Wood and Co., New York (1919).
- Choukévitich, J. - Étude de la flore bactérienne du gros intestin du cheval. Ann.Inst.Pasteur 25, 247 (1911). - in: Prevot (1938).

- Colowick, S.P. and N.O.Kaplan. - Methods in Enzymology.
Academic Press, New York (1955).
- Dehnert, J. - Untersuchungen über die grampositive Stuhl-
flora des Brustmilchkindes. Zentralbl.Bakteriol.I.Orig.
160, 66-79 (1957).
- Listaso, A. - Contribution a l'etude sur l'intoxication
intestinale. Zentralbl.Bakteriol.I.Orig.62, 433-468 (1912).
- Dugal, B.S.- Z.Biol. in unserer Zeit 2, 3.Jg.41-49 (1973).
- Eggerth, A.H.- The gram-positive non-spore-bearing anaerobic
bacilli of human feces. J.Bacteriol.30, 277-289 (1935).
- Exterkate, F.A., B.J.Otten, H.W.Wassenberg and J.H.Veerkamp.-
Comparison of the phospholipid composition of Bifido-
bacterium and Lactobacillus strains. J.Bacteriol.106,
824-829 (1971).
- Frank, H.H. and C.E.Skinner. - The relationship between
Actinomyces bovis and Lactobacillus bifidus. Mycologia
46, 728-735 (1954).
- Gasperi, De. - Flore intestinale des rates blancs au regime
ordinaire et au regime carne. Zentralbl.Bakteriol.I.Orig.
57, 519. (1911). in: Boventer (1949).
- Gasser, F. - Electrophoretic characterization of lactic
dehydrogenases in the genus Lactobacillus. J.Gen.
Microbiol. 62, 223-239 (1970).
- Gasser, F. and M.Mandel. - Deoxyribonucleic acid base composi-
tion of the genus Lactobacillus. J.Bacteriol.96, 580-588
(1968).

- Georg, L.K., G.W.Roberstad, S.A.Brinkman, and M.D.Hicklin.-
A new pathogenic anaerobic Actinomyces species. J.
Infect.Dis. 115, 88-99 (1965).
- Glick, M.C., T.Sall, F.Zilliken and S.Mudd. - Morphological
changes of Lactobacillus bifidus var. pennsylvanicus
produced by a cell-wall precursor. Biochim.Biophys.Acta
37, 361-363 (1960).
- Goldberg, M.L. and E.Racker. - Formation and isolation of a
glycolaldehyde-phosphoketolase intermediate. J.Biol.
Chem.237, 3841-3842 (1962).
- Good, N.E., G.D.Winget, W.Winter, T.N.Conolly, S.Izawa and
R.M.M.Singh. - Hydrogen ion buffers for biological
Research. Biochem.5, 467-477 (1966).
- Gyllenberg, H.G. - The development of the "straight rod type"
of Lactobacillus bifidus. J.Gen.Microbiol.13, 394-397
(1955).
- Gyllenberg, H.G. - Specific contaminants in cultures of
bifid bacteria (Lactobacillus bifidus). Acta Path.Microbiol
Scand.44, 293-298 (1958).
- Gyllenberg, H.G. and G.Carlberg. - The nutritional characteri-
stics of the bifid bacteria (Lactobacillus bifidus) of
infants. Acta Path.Microbiol.Scand. 44, 287-292 (1958).
- György, P., R.F.Norris and C.S.Rose. - Bifidus factor I. A
variant of Lactobacillus bifidus requiring a special
growth factor. Arch.Biochem.Biophys.48, 193-201 (1954).
- Hassinen, J.B., G.T.Durbin, R.M.Tomarelli and F.W.Bernhart. -
The minimal nutritional requirements of Lactobacillus
bifidus. J.Gen.Microbiol.62, 771-777 (1951).

- Heath, E.C., J.Hurwitz, B.L.Horecker and A.Ginsburg (1958).
in: Goldberg und Racker (1962).
- Hohorst, H.J. in: Methoden der enzymatischen Analyse (H.U.
Bergmeyer), 2.Auflage, Verlag Chemie, Weinheim (1970).
- Holdeman, L.V. and W.E.C.Moore. - Anaerobe laboratory manual.
Virginia Polytechnic Institute and State University,
Blacksburg (1972).
- Holland, D.F. - Generic index of the commoner forms of bacteria.
J.Bacteriol.5, 215-229 (1920).
- Holzapfel, W., V.Scardovi and O.Kandler. - Die Aminosäure-
sequenz des Ornithin und Lysin enthaltenden Mureins einiger
Stämme von Lactobacillus bifidus aus dem Pansen. Z.Natur-
forsch.24 B, 1524-1528 (1969).
- Holz, G. und H.U.Bergmeyer. - in: Methoden der enzymatischen
Analyse (H.U.Bergmeyer). 2.Auflage, Verlag Chemie,
Weinheim (1970).
- Holzer, H. and Schröter (1962). - in: Goldberg und Racker
(1962).
- Hull, T.G. and L.F.Rettger. - The influence of milk and
carbohydrate feeding on the charakter of the intestinal
flora of white rats. Diet versus bacterial implantation.
J.Biochem.2, 47 (1917). - in: T.Mitsuoka (1969).
- Husain, I., J.A.Poupard and R.F.Norris. - Influence of
nutrition on the morphology of a strain of Bifidobacterium
bifidum. J.Bacteriol. 111, 841-844 (1972).
- Jacobson, G. - Modification de la flore intestinal du jeune
chien alimenté avec du lait de femme.C.r.Soc.Biol.(1949). -
in: Boventer (1949).

- Jago, G.R., L.W.Nichol, K.O'Dea and W.H.Sawyer. - Physico-chemical studies on the lactate dehydrogenase of *Streptococcus cremoris* US 3: The effects of modifiers. *Biochim. Biophys.Acta* 250, 271-285 (1971).
- Jonas, H.A., R.F.Anders and G.R.Jago. - Factors affecting the activity of the lactate dehydrogenase of *Streptococcus cremoris*. *J.Bacteriol.*111, 397-403 (1972).
- Kandler, O. - Die chemische Zusammensetzung der Bakterienzellwand als chemotaxonomisches Merkmal. *Zentralbl.Bakteriol. I.Orig.*205, 197-210 (1967).
- Kandler, O. - Amino acid sequence of the murein and taxonomy of the genera *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Leuconostoc*, and *Pediococcus*. *Int.J.Syst.Bacteriol.*20, 491-507 (1970).
- Kandler, O. und E.Lauer, - Neuere Vorstellungen zur Taxonomie der Bifidobakterien. *Zentralbl.Bakteriol.I.Orig.A*, 228, 29-45 (1974).
- Kandler, O. und C.Zehender. - Papierchromatographische Untersuchung der Aminosäurezusammensetzung verschiedener Bakterien-Hydrolysate. *Arch.Mikrobiol.*24, 41-48 (1956).
- Kandler, O., D.Koch and K.H.Schleifer. - Die Aminosäuresequenz eines glycinhaltigen Mureins einiger Stämme von *Lactobacillus bifidus*. *Arch.Mikrobiol.*61, 181-186 (1968).
- Koch, D. - Zellwandzusammensetzung und Taxonomie der Gattung *Bifidobacterium*. *Dissertation*, TH München (1969).
- Koch, D., K.H.Schleifer und O.Kandler. - Die Aminosäuresequenz des Serin und Asparaginsäure enthaltenden Mureins von *Bifidobacterium bifidum* Orla-Jensen. *Z.Naturforsch.*25B, 1294-1301 (1970 a).

- Koch, D., K.H.Schleifer und O.Kandler. - Die Aminosäuresequenz des Threonin und Serin enthaltenden Mureins von *Bifidobacterium longum* Reuter. Arch.Mikrobiol.74, 315-325 (1970 b).
- Kojima, M., S.Suda, S.Hotta and K.Hamada. - Induction of pleomorphism in *Lactobacillus bifidus*. J.Bacteriol.95, 710-711 (1968).
- Kojima, M., S.Suda, S.Hotta and K.Hamada. - Induction of pleomorphism and calcium ion deficiency in *Lactobacillus bifidus*. J.Bacteriol. 102, 217-220 (1970).
- Kojima, M., S.Suda, S.Hotta, K.Hamada and A.Suganuma. - Necessity of calcium ion for cell division in *Lactobacillus bifidus*. J.Bacteriol. 104, 1010-1013 (1970).
- Kuhn, R. und H.Tiedemann. - Zum Stoffwechsel des *Lactobacillus bifidus*. Z.Naturforsch.8 B, 428-436 (1953).
- King, J. - in: Methoden der enzymatischen Analyse (H.U.Bergmeyer). 2.Auflage. Verlag Chemie, Weinheim (1970).
- Lambert, R., Y.Saito and J.H.Veerkamp. - Incorporation of labeled derivatives of 2-deoxy-2-amino-D-glucose into the cell walls of *Lactobacillus bifidus* var. *pennsylvanicus*. Arch.Biochem.Biophys.110, 341-344 (1965).
- Laskin, A.I. and H.A.Lecchevalier. - Handbook of Microbiology, Vol.2, The Chemical Rubber Co., Cleveland, Ohio, U.S.A. (1973).
- Lineweaver, H. and D.Burk. - The determination of enzyme dissociation constants. J.Am.Chem.Soc. 56, 658-666 (1934).
- Lipmann, F. and L.C.Tuttle. - A specific micromethod for determination of acyl-phosphates. J.Biol.Chem.150, 21-28 (1945).

- London, J. and K.Kline. - Aldolase of lactic acid bacteria: a case history in the use of an enzyme as an evolutionary marker. *Bact.Rev.* 37, 453-478 (1973).
- Lotti, C. Contributo alla conoscenza dei germi anaerobi dell' intestino in condizioni patologiche. *Ann.Igiene Sperim.* 19, 75 (1909). - in: Prévot (1938).
- Lowry, O.H., N.J.Rosebrough, A.L.Farr and R.J.Randall. - Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol.Chem.* 193, 265-275 (1951).
- Mal'vot, G. and A.Bauer. - Beobachtungen am *Bacterium bifidum*. *Z.Kinderheilkunde* 68, 358-367 (1950).
- Man, J.C. de, M.Rogosa and M.E.Sharpe. - A medium for the cultivation of *Lactobacilli*. *J.Appl.Bacteriol.* 23, 130-135 (1960).
- Matteuzzi, D., F.Crociani, G.Zani and L.D.Trovatelli. - *Bifidobacterium suis* n.sp.: a new species of the genus *Bifidobacterium* isolated from pig feces. *Z.Allg.Mikrobiol.* 11, 387-395 (1971).
- Matteuzzi, D. and F.Crociani. - Urease production and deoxyribonucleic acid homology in the species *Bifidobacterium suis*. *Arch.Mikrobiol.* 94, 93-95 (1973) (Kurze Mitteilungen)
- Maurer, H.R. - Disk-Elektrophorese. Walter de Gruyter Verlag Berlin (1968).
- Mitsuoka, T. - Vergleichende Untersuchungen über die *Bifidobakterien* aus dem Verdauungstrakt von Menschen und Tieren. *Zentralbl.Bakteriol.I.Orig.* 210, 52-64 (1969).

- Mitsuoka, T., Y.Morishita, A.Terada und K.Watanabe. -
Actinomyces eriksonii Georg, Robertstad, Brinkman und
Hicklin 1965 identisch mit Bifidobacterium adolescentis
Reuter 1963. Zentralbl.Bakteriol.I.Orig.226, 257-263
(1974).
- Moore, W.E.C. - Relationships of metabolic products to
taxonomy of anaerobic bacteria. Int.J.Syst.Bacteriol.
20, 535-538 (1970).
- Moore, W.E.C. and L.V.Holdeman. - New names and combinations
in the genera Bacteroides Castellani and Chalmers,
Fusobacterium Knorr, Eubacterium Prevot, Propionibacterium
Delwich, and Lactobacillus Orla-Jensen. Int.J.Syst.
Bacteriol. 23, 69-74 (1973).
- Mou, L., D.P.Mulvena, H.A.Jonas and G.R.Jago. - Purification
and properties of nicotinamide adenine dinucleotide-
dependent D- and L-lactate dehydrogenases in a group N
Streptococcus. J.Bacteriol.111, 392-396 (1972).
- Nannizzi, A. - Repertio sistematico dei miceti dell-uomo e
degli animali. G.pollacci (ed.), Tratto di Micopathologia
Umana (Sienna) 4, 13 (1934).
- Negroni, P. and I.Fischer. - Estudio sobre el Lactobacillus
bifidus (Tissier) kulp y Rettger.Rev.Soc.Argent.Biol.20,
313-327 (1944).
- Neimark, H. and R.M.Lemcke. - Occurrence and Properties of
lactic dehydrogenases of fermentative Mycoplasmas.
J.Bacteriol.111, 633-640 (1972).
- Neish, A.C. - Analytical methods for bacterial fermentations.
National Research Council of Canada, 46-8-3. Saskatoon,
1-18 (1952).

- Norris, R.F., T.Flanders, R.M.Tomarelli and G.György. -
The isolation and cultivation of *Lactobacillus bifidus*.
A.comparison of branched and unbranched strains. J.
Bacteriol.60, 681-696. (1950).
- O'Brien, P.J., M.C.Glick and F.Zilliken. - Acidic amino-
sugars from bacterial. Incorporation of (1-¹⁴C)-,
-methyl-N-acetyl-D-glucosaminide into muramic acid.
Biochim.Biophys.Acta 37, 357-360 (1960).
- Olsen, E. - Studies on the intestinal flora of infants.
Ejnar Munksgaard, Coopenhagen. (1949).
- Orla-Jensen, S. - La classification des bacteries lactiques.
Lait 4, 468-474 (1924).
- Orla-Jensen, S., A.D.Orla-Jensen und O.Winther. - Bacterium
bifidum und Thermobacterium intestinale. Zentralbl.
Bakteriol.II, 93, 321-343 (1936).
- Petit, J.F., J.L.Strominger and D.Söll. - Biosynthesis of the
peptidoglycan of bacterial cell walls. VII. Incorporation
of serine and glycine into interpeptide bridges in
Staphylococcus epidermidis. J.Biol.Chem. 243, 757-768 (1966)
- Petuely, F. und F.Eichler. - Beeinflussung der Wuchsformen
des *Lactobacillus bifidus*. Z.Naturforsch.9b, 229 (1954).
- Pine, L. - Classification and phylogenetic relationship of
microaerophilic actinomycetes. Int.J.Syst.Bacteriol.20,
445-474 (1970).
- Pine, L. and L.Georg. - The classification and phylogenetic
relationships of Actinomycetales. Int.J.Syst.Bacteriol.
15, 143-163 (1965).

- Pine, L. and H.Howell. - Comparison of the physiological and biochemical characters of Actinomyces species with those of Lactobacillus. J.Gen.Microbiol.15, 428-445 (1956).
- Plotho, O. von. - Untersuchungen an Bacterium bifidum. Zentralbl.Bakteriol.I.Orig. 152, 90-95 (1947).
- Poupard, J.A., I.Husain and R.F.Norris. - Biology of the bifidobacteria. Bacteriol.Rev.37, 136-165 (1973).
- Prévot, A.-R. - Études de systématique bactérienne. III. Invalidité du genre Bacteroides Castellani et Chalmers; démembrement et reclassification. Ann.Inst.Pasteur 60, 285-307 (1938).
- Prévot, A.-R. - Manuel de classification et de détermination des bactéries anaérobies. 3.Auflage, Masson, Paris (1957).
- Prévot, A.-R. - Traité de Systématique Bactérienne, Tome II. Dunod, Paris (1961).
- Prévot, A.-R. - Importance of the biochemical composition of the cell wall as a taxonomic characteristic. Int.J.Syst. Bacteriol.20, 530-540 (1970).
- Puntoni, V. - Sui rapporti fra gli attinomiceti anaerobi tipo "Wolff-Israel" ed il "Bacterium bifidum". Rend.Acad. Sci.Fis.Mat. (Roma). 23, 274-276 (1936).
- Puntoni, V. - Suile relazioni fra il B. bifido gli attinomiceti anaerobi typo Wolff-Israel. Ann.Igiene Sperim.47, 157-168 (1937).
- Rauen, H.M. - Biochemisches Taschenbuch. 2.Auflage, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1964.
- Reuter, G. - Vergleichende Untersuchungen über die Bifidus-Flora in Säuglings- und Erwachsenenstuhl.Zentralbl.Bakteriol. I.Orig.191, 486-507 (1964).

- Reuter, G. - Designation of type strains for *Bifidobacterium* species. *Int.J.Syst.Bacteriol.*21, 273-275 (1971).
- Roberts, W.S.L., J.F.Petit and J.L.Strominger. - Biosynthesis of the peptidoglycan of bacterial cell walls. VIII. Specificity in the utilization of L-alanyl transfer ribonucleic acid for interpeptide bridge synthesis in *Arthrobacter crystallopoietes*. *J.Biol.Chem.*243, 768-773 (1968).
- Rose, J.A. - in: S.P.Colowick and N.O.Kaplan. *Methods in Enzymology*, Academic Press, New York, Bd.1, S.591 (1955).
- Scardovi, V. - Studies in rumen bacteriology. IV. The formation of acetate through phosphorolytic cleavage of fructose-6-phosphate in a group of branched Gram-positive bacteria isolated from sheep rumen. *Ann.Microbiol.*14, 189-198 (1964).
- Scardovi, V. and L.D.Trovatelli. - The fructose-6-phosphate shunt as a peculiar pattern of hexose degradation in the genus *Bifidobacterium*. *Ann.Microbiol.* 15, 19-29 (1965).
- Scardovi, V. and L.D.Trovatelli. - New species of bifid bacteria from *Apis mellifica* L. and *Apis indica* F. A contribution to the taxonomy and biochemistry of the genus *Bifidobacterium*. *Zentralbl.Bakteriol.II.Abt.*123, 64-88 (1969).
- Scardovi, V., L.D.Trovatelli, F. Crociani and B.Sgorbati. - Bifid bacteria in bovine rumen. New species of the genus *Bifidobacterium*: *B.globosum* n.sp. and *B.ruminale* n.sp.. *Arch.Mikrobiol.* 68, 278-294 (1969).

- Scardovi, V., G.Zani and L.D.Trovatelli. - Deoxyribonucleic acid homology among species of the genus *Bifidobacterium* isolated from animals. *Arch.Mikrobiol.* 72, 318-325 (1970).
- Scardovi, V., B.Sgorbati and G.Zani. - Starch gel electrophoresis of fructose-6-phosphate phosphoketolase in the genus *Bifidobacterium*. *J.Bacteriol.* 106, 1036-1039 (1971).
- Scardovi, V., L.D.Trovatelli, G.Zani, F.Crociani and D.Matteuzzi. Deoxyribonucleic acid homology relationships among species of the genus *Bifidobacterium*. *Int.J.Syst.Bacteriol.* 21, 276-294 (1971).
- Scardovi, V. and F.Crociani. - *Bifidobacterium catenulatum*, *Bifidobacterium dentium* and *Bifidobacterium angulatum*: Three new species and their deoxyribonucleic acid homology relationships. *Int.J.Syst.Bacteriol.* 24, 6-20 (1974).
- Scardovi, V. and L.D.Trovatelli. - *Bifidobacterium animalis* (Mitsuoka) comb.nov.and the "minimum" and "subtile" groups of new bifidobacteria found in sewage. *Int.J.Syst. Bacteriol.* 24, 21-28 (1974).
- Scardovi, V. and G.Zani. - *Bifidobacterium magnum* sp.nov., a large, acidophilic *Bifidobacterium* isolated from rabbit feces. *Int.J.Syst.Bacteriol.* 24, 29-34 (1974).
- Schleifer, K.H. und O.Kandler, - Zur chemischen Zusammensetzung der Zellwand der Streptokokken. I. Die Aminosäuresequenz des Mureins von *Str.thermophilus* and *Str. faecalis*. *Arch.Mikrobiol.* 57, 335-364 (1967).
- Schleifer, K.H. und O.Kandler. - Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol.Rev.* 36, 407-477 (1972).

- Schleifer, K.H. and M.Kocur. - Classification of staphylococci based on chemical and biochemical properties. Arch.Mikrobiol. 93, 65-85 (1973).
- Schramm, M., V.Klybas and E.Racker. - Phosphorolytic cleavage of fructose-6-phosphate by fructose-6-phosphate phosphoketolase from *Acetobacter xylinum*. J.Biol.Chem. 233, 1283-1288 (1958).
- Sebald, M., F.Gasser and H.Werner. - Teneur GC% et classification. Application au groupe des bifidobactéries et à quelques genres voisins. Ann.Inst.Pasteur 109, 251-269 (1958).
- Sokatch, J.T. - Ribose biosynthesis by *Streptococcus faecalis*. Arch.Biochem.Biophys.91, 240-246 (1960).
- Spackman, D.H., W.H.Stein, S.Moore. - Automatic recording apparatus for use in chromatography of amino acids. Anal.Chem.30, 1190-1205 (1958).
- Stackebrandt, E.- Biochemisch-taxonomische Untersuchungen an der Gattung *Cellulomonas*. Dissertation. Universität München (1974).
- Stetter, K.O. - Physiologisch-biochemische Untersuchungen zur Bildung von Milchsäureisomerenmischungen bei Lactobacillen. Dissertation, Technische Universität, München (1973).
- Staudenbauer, W. - D-aspartic acid incorporation into interpeptide bridges in bacterial cell walls. Fed.Proc.27, 294 (1968).
- Sundman, V. and K.Björkstén. - The globular involution forms of the bifid bacteria. J.Gen.Microbiol. 10, 491-496 (1958).

- Sundman, V., K.Björkstén and H.G.Gyllenberg. - Morphology of the bifid bacteria (organisms previously incorrectly designated *Lactobacillus bifidus*) and some related genera. *J.Gen.Microbiol.*21, 371-384 (1959).
- Tissier, H. - Recherches sur la flore intestinale des nourrissons (état normal et pathologique). Thèses, Paris, 1-253 (1900).
- Trevelyan, W.E., D.D.Procter and J.S.Harrison. - Detection of sugars on paper chromatograms. *Nature (London)* 166, 444-445 (1950).
- Varner, J.E. - Chromatographic analyses of organic acids, - in: *Methods in Enzymology*, Bd.III, 397-402 (1957).
- Veerkamp, J.H. - Catabolism of glucose and derivatives of 2-deoxy-2-amino-glucose in *Bifidobacterium bifidum* var. *pennsylvanicum*. *Arch.Biochem.Biophys.*129, 257-263 (1969).
- Vries, W. de, S.J.J.Gerbrandy and A.H.Stouthamer. - Carbohydrate metabolism in *Bifidobacterium bifidum*. *Biochim.Biophys. Acta* 136, 415-425 (1967).
- Vries, W.de, and A.H.Stouthamer. - Pathway of glucose fermentation in relation to the taxonomy of bifidobacteria. *J. Bacteriol.*93, 574-576 (1967).
- Vries, W.de, and A.H.Stouthamer. - Fermentation of glucose, lactose, galactose, mannitol, and xylose by bifidobacteria. *J.Bacteriol.*96, 472-478 (1968).
- Vries, W.de, and A.H.Stouthamer. - Factors determining the degree of anaerobiosis of *Bifidobacterium* strains. *Arch. Mikrobiol.*65, 275-287 (1969).

- Vries, W.de, W.M.C.Kapteijn, E.G.van der Beek and A.H. Stouthamer. - Molar growth yields and fermentation balances of *Lactobacillus casei* L3 in batch cultures and in continuous cultures. *J.Gen.Microbiol.*63, 333-345 (1970).
- Vuillemin, P. - Les champignons parasites et les mycoses de l'homme. Lechevalier, Paris (1931).
- Weiss, J.E. - *Lactobacillus bifidus* Tissier and its biological position in the group of aciduric organisms. Dissertation, Yale University, New Haven, Conn. (1933).
- Weiss, J.E. and L.F.Rettger. - *Lactobacillus bifidus*. *J.Bacteriol.*28, 501-521 (1934).
- Weiss, J.E. and L.F.Rettger. - Taxonomic relationship of *Lactobacillus bifidus* (*Bacillus bifidus* Tissier) and *Bacteroides bifidus* (Eggerth). *J.Bacteriol.*35, 17-18 (1938).
- Werner, H. - Zum Vorkommen von Bifidusbakterien und morphologisch ähnlichen Keimen in der Mundhöhle Erwachsener. *Zentralbl.Bakteriol.I.Orig.*193, 331 (1964).
- Werner, H. - The gram-positive nonsporing anaerobic bacteria of the human intestine with particular reference to the corynebacteria and bifidobacteria. *J.appl.Bacteriol.*29, 138-146 (1966).
- Werner, H., F.Gasser and M.Se bald. - DNS-Basenbestimmungen an 28 Bifidus-Stämmen und an Stämmen morphologisch ähnlicher Gattungen. *Zentralbl.Bakteriol.I.Orig.*198, 504-516 (1966).
- Werner, H. und S.Mann. - Chemische Analyse der Zellwand von *Corynebacterium acnes* und *Corynebacterium parvum*. *Zentralbl.Bakteriol.I.Orig.*206, 486-499 (1968).

Die vorgelegte Arbeit wurde am Institut für Allgemeine Botanik der Ludwig-Maximilians-Universität München unter der Leitung von Prof.Dr.O.Kandler von August 1970 bis November 1974 angefertigt.

Herrn Prof.Kandler gilt mein besonderer Dank für die Anteilnahme an meiner Arbeit sowie für alle Unterstützung und wertvollen Hinweise.

Mein Dank gilt auch den kollegialen Mitarbeitern am Botanischen Institut.

Frau Leonore Hagner, Frau Ann Moore, Fräulein Gerlinde Naeser und Fräulein Christine Schimmack danke ich für sorgfältige Assistenz.

Lebenslauf

Am 6. Februar 1942 wurde ich, Eckhard Lauer, als Sohn des Komponisten Erich Oskar Lauer und seiner Frau Klarlies, geb. Blattmann, in Murnau/Obb. geboren.

Von 1948 bis 1953 besuchte ich in Murnau die Volksschule, anschließend die Oberrealschule in Garmisch-Partenkirchen. Bereits 1954 wechselte ich zum Bunsen-Gymnasium Heidelberg, 1958 nochmals nach Weilheim/Obb., wo ich die Oberrealschule besuchte und 1964 mit der Reifeprüfung abschloß.

Im WS 1964 begann ich mit dem Fachstudium in Richtung Mikrobiologie an der Technischen Universität München und legte im SS 1969 die Diplomprüfung für Biologen ab.

Die vorliegende Arbeit begann ich im August 1970 unter der Anleitung von Prof. Dr. O. Kandler am Botanischen Institut der Universität München. Während dieser Zeit war ich zunächst als wissenschaftliche Hilfskraft, ab Januar 1971 als Zeitangestellter bei der Gesellschaft für Strahlenforschung m.b.H., München, und ab September 1972 als wissenschaftlicher Angestellter im Aufgabenbereich der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen in der Gesellschaft für Strahlenforschung m.b.H., München, tätig.

Seit dem 30. März 1970 bin ich verheiratet und habe eine Familie mit drei Kindern.

Introduction

In the year 1811, when the English people, with their
eyes turned towards the East, were looking for a new
field of action, the British Government, in order to
secure the peace of the world, and to prevent the
spread of the French Revolution, decided to send
a fleet to the East Indies, and to establish a
military and naval station in the island of Ceylon.
The British Government, in order to secure the
peace of the world, and to prevent the spread of
the French Revolution, decided to send a fleet to
the East Indies, and to establish a military and
naval station in the island of Ceylon.

In the year 1811, when the English people, with their
eyes turned towards the East, were looking for a new
field of action, the British Government, in order to
secure the peace of the world, and to prevent the
spread of the French Revolution, decided to send a
fleet to the East Indies, and to establish a
military and naval station in the island of Ceylon.
The British Government, in order to secure the
peace of the world, and to prevent the spread of
the French Revolution, decided to send a fleet to
the East Indies, and to establish a military and
naval station in the island of Ceylon.

In the year 1811, when the English people, with their
eyes turned towards the East, were looking for a new
field of action, the British Government, in order to
secure the peace of the world, and to prevent the
spread of the French Revolution, decided to send a
fleet to the East Indies, and to establish a
military and naval station in the island of Ceylon.

